

# Sequenciação de Nova Geração Aplicada à Investigação de Doenças Raras

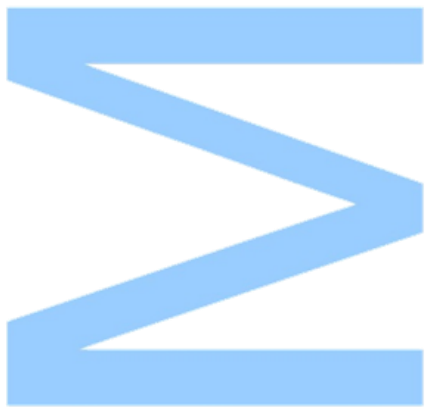
Mateus Pereira Laranjeira  
Dissertação de Mestrado apresentada à  
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto em  
Biologia Celular e Molecular  
2022

MSc  
2.º CICLO  
FCUP  
2022

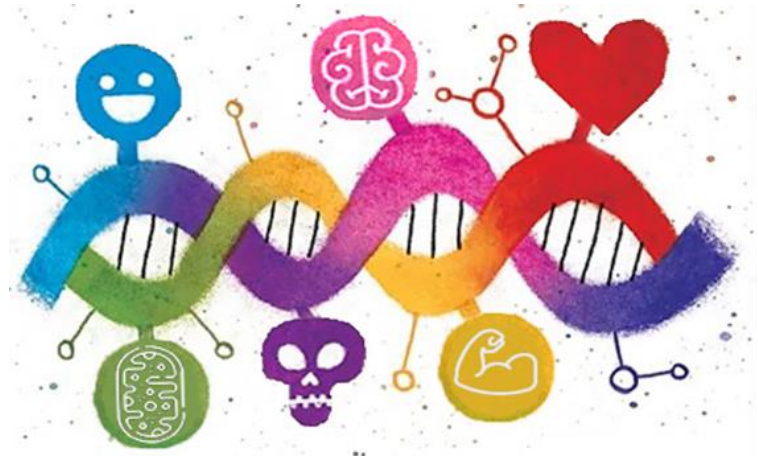


Sequenciação de Nova Geração Aplicada à  
Investigação de Doenças Raras

Mateus Pereira Laranjeira  
FC







# Sequenciação de Nova Geração Aplicada à Investigação de Doenças Raras

Mateus Pereira Laranjeira

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia

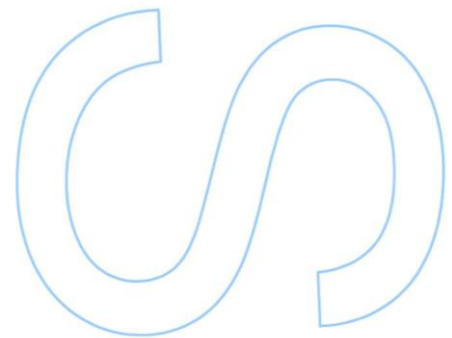
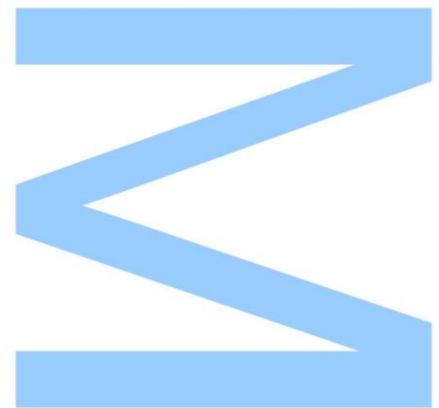
2021/2022

## Orientador

Célia Nogueira, PhD, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

## Coorientador

Vasco Martins de Almeida, Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto





Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**N**

**S**

**R**



## Declaração de Honra

Eu, Mateus Pereira Laranjeira, inscrito no Mestrado em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto declaro, nos termos do disposto na alínea a) do artigo 14.º do Código Ético de Conduta Académica da U.Porto, que o conteúdo do presente relatório de estágio reflete as perspetivas, o trabalho de investigação e as minhas interpretações no momento da sua entrega.

Ao entregar este relatório de estágio, declaro, ainda, que a mesma é resultado do meu próprio trabalho de investigação e contém contributos que não foram utilizados previamente noutros trabalhos apresentados a esta ou outra instituição.

Mais declaro que todas as referências a outros autores respeitam escrupulosamente as regras da atribuição, encontrando-se devidamente citadas no corpo do texto e identificadas na secção de referências bibliográficas. Não são divulgados no presente relatório de estágio quaisquer conteúdos cuja reprodução esteja vedada por direitos de autor.

Tenho consciência de que a prática de plágio e auto-plágio constitui um ilícito académico.

Mateus Laranjeira

Porto, 12 de dezembro de 2022





# Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora Célia Nogueira pela sua disponibilidade, pelo seu apoio e por todo o conhecimento transmitido durante a realização deste estágio. Agradeço também por ter despertado o meu fascínio pela área das doenças metabólicas e das citopatias mitocondriais.

À Doutora Laura Vilarinho, por me ter acolhido e me ter dado a oportunidade de estagiar na Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética do Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

Agradeço também a todos os membros desta unidade, pelo profissionalismo e todos os conselhos e ensinamentos que contribuíram para a minha aprendizagem.

Um obrigado à minha família e em especial aos meus pais, Estêvão e Rosália, e ao meu irmão Lucas, pelo encorajamento e apoio incondicional proporcionado. Fico muito contente por poder partilhar convosco a conclusão de mais uma etapa da minha vida.

Por último, aos meus amigos, por todo o apoio e bons momentos e por me terem mantido motivado durante a realização deste trabalho.



## Resumo

As doenças raras (DR) afetam aproximadamente 3,5 a 5,9% da população mundial. Em Portugal, estima-se que existam 600 mil a 800 mil portadores de DR, afetando cerca de 6 a 8% da população nacional. Aproximadamente 80% destas doenças têm etiologia genética e, nos últimos anos, o número de genes e de variantes associadas a DR tem aumentado rapidamente devido à aplicação da tecnologia de sequenciação de nova geração e ao desenvolvimento de *pipelines* bioinformáticas para a análise dos respetivos dados.

As doenças hereditárias do metabolismo são um subgrupo das DR que causam o comprometimento de determinada via metabólica. Laboratorialmente, o seu diagnóstico é efetuado em múltiplos níveis, tanto pela análise bioquímica de substratos, metabolitos e atividades enzimáticas, como pela análise molecular. O diagnóstico molecular tem um papel essencial neste processo, não só por permitir um diagnóstico pré-natal e um aconselhamento genético mais preciso aos casais em risco, como também por contribuir para a compreensão da fisiopatologia da própria doença e respetivas opções terapêuticas.

O principal objetivo do presente estudo foi esclarecer a etiologia molecular de 23 doentes através da análise do exoma clínico, aplicando a tecnologia de sequenciação de nova geração e respetiva análise bioinformática.

Foi obtido um diagnóstico molecular positivo em 39% (9/23) dos doentes analisados. As variantes identificadas abrangem os genes: *MCEE*, *TCN1*, *MECR*, *VARS2*, *SPG7*, *NARS2*, *SURF1*, *DARS2* e *KARS1*. O espectro mutacional abrange 9 variantes descritas como patogénicas, uma variante já descrita como de significado indeterminado e uma grande deleção. Neste trabalho serão ainda reportadas duas novas variantes com significado clínico desconhecido não descritas na literatura.

Em suma, este estudo permitiu identificar a causa genética de 39% dos doentes estudados e ampliar o espectro mutacional associado às DR.

## Palavras-Chave

Bioinformática; Diagnóstico Molecular; Doenças hereditárias do metabolismo; Doenças mitocondriais; Doenças raras; Sequenciação de Nova Geração.

## **Abstract**

*Rare diseases (RD) affect approximately 3,5 to 5,9% of the world's population. In Portugal, it is estimated that there are 600,000 to 800,000 carriers of RD, affecting about 6 to 8% of the national population. Near 80% of RD have a genetic etiology and, in recent years, the number of genes and variants associated with a RD increased rapidly due to the development of next-generation sequencing technologies and bioinformatics pipelines for the respective data analysis.*

*Inherited metabolic disorders are a subgroup of RD that cause impairment of a particular metabolic pathway. Its diagnosis is performed at multiple levels, both through the biochemical analysis of substrates, metabolites and enzymatic activities, as well as through molecular analysis. Molecular diagnosis plays an essential role in this process, not only because it allows a prenatal diagnosis and a more accurate genetic counseling for at-risk couples, but also because it contributes to the understanding of the pathophysiology of the disease itself and respective therapeutic options.*

*The overall aim of the present study was to clarify the molecular etiology of 23 patients through the analysis of their clinical exome, using next-generation sequencing technology and the respective bioinformatic analysis.*

*A positive molecular diagnosis was obtained in 39% (9/23) of the studied patients. The identified variants cover the genes: MCEE, TCN1, MECR, VARS2, SPG7, NARS2, SURF1, DARS2 and KARS1. The mutational spectrum includes 9 variants described as pathogenic, one variant already described as of undetermined significance and a gross deletion. In this work, we will also report two novel variants with unknown clinical significance not described in the literature.*

*In summary, this study allowed the identification of the genetic cause in 39% of the studied patients and the expansion of the mutational spectrum associated with RD.*

## **Key Words**

*Bioinformatics; Inborn disorders of metabolism; Mitochondrial diseases; Molecular Diagnosis; Next Generation Sequencing; Rare diseases.*

# Índice

## Capítulo 1

Contextualização do estágio .....	1
-----------------------------------	---

## Capítulo 2

Introdução.....	5
2.1 Doenças Raras.....	7
2.1.1 Conceito e Prevalência .....	7
2.1.2 Diagnóstico .....	8
2.1.3 Programa Nacional de Rastreio Neonatal .....	10
2.1.4 Tratamento .....	10
2.1.4.1 Terapias de substituição enzimática e restrição dietética .....	11
2.1.4.2 Medicamentos órfãos .....	11
2.1.4.3 Terapia celular.....	12
2.1.4.4 Terapia génica.....	12
2.1.5 Importância do aconselhamento genético .....	13
2.2 Doenças Hereditárias do Metabolismo .....	14
2.2.1 Doenças do metabolismo intermediário .....	14
2.2.1.1 Aminoacidopatias .....	15
2.2.1.2 Acidúrias orgânicas .....	16
2.2.1.3 Defeitos do ciclo da ureia .....	16
2.2.1.4 Defeitos do metabolismo intermediário dos carboidratos.....	17
2.2.2 Doenças do metabolismo energético .....	18
2.2.2.1. Defeitos na $\beta$ -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos .....	18
2.2.2.2 Acidoses lácticas congénitas .....	19
2.2.2.3. Glicogenoses.....	20
2.2.2.4 Doenças mitocondriais .....	21
2.2.3 Doenças das moléculas complexas .....	21
2.2.3.1 Defeitos congénitos da glicosilação .....	21
2.2.3.2 Doenças lisossomais de sobrecarga .....	23
2.2.3.3 Doenças peroxissomais.....	25
2.3 Doenças mitocondriais .....	26
2.3.1. Mitocôndria .....	26
2.3.2 Genoma mitocondrial vs. Genoma nuclear .....	27
2.3.3 Doenças mitocondriais causadas por alterações no genoma mitocondrial ..	28
2.3.3.1 Heteroplasmia e Efeitos <i>Threshold</i> e <i>Bottleneck</i> .....	29

2.3.3.2 Mutações pontuais .....	30
2.3.3.3 Rearranjos do mtDNA .....	31
2.3.4 Doenças mitocondriais causadas por alterações no genoma nuclear .....	33

### Capítulo 3

Objetivos.....	35
----------------	----

### Capítulo 4

Doentes e Métodos.....	39
4.1 Doentes.....	41
4.2 Métodos .....	43
4.2.1 Extração e quantificação do DNA e RNA .....	43
4.2.2 Sequenciação de Nova Geração .....	43
4.2.2.1 Captura dos genes e NGS.....	43
4.2.2.2 <i>Variant calling</i> e anotação das variantes .....	43
4.2.2.3 Análise das variantes .....	44
4.2.3 <i>Pipeline</i> bioinformática.....	44
4.2.4 Estudo do RNA .....	46
4.2.4.1 Síntese do cDNA.....	46
4.2.4.2 Desenho dos <i>primers</i> .....	46
4.2.4.3 Reação de PCR .....	47
4.2.4.4 Sequenciação de Sanger .....	48

### Capítulo 5

Resultados e Discussão .....	49
5.1 Gene <i>MCEE</i> .....	52
5.2 Gene <i>TCN1</i> .....	54
5.3 Gene <i>MECR</i> .....	56
5.4 Gene <i>VARS2</i> .....	58
5.5 Gene <i>SPG7</i> .....	60
5.6 Genes <i>NARS2</i> , <i>SURF1</i> , <i>DARS2</i> e <i>KARS1</i> .....	61
5.6.1 Gene <i>NARS2</i> .....	61
5.6.2 Gene <i>SURF1</i> .....	62
5.6.3 Genes <i>DARS2</i> e <i>KARS1</i> .....	63

### Capítulo 6

Conclusões e Perspetivas Futuras.....	67
---------------------------------------	----

**Capítulo 7**

Referências bibliográficas..... 71

**Anexos**..... 89

8.1 Genes incluídos no painel de exoma clínico.....91

# Índice de Figuras

<b>Figura 1</b>   Representação esquemática do genoma mitocondrial humano.....	27
<b>Figura 2</b>   Complexo da OXPHOS: subunidades estruturais e fatores de <i>assembly</i> associados.....	29
<b>Figura 3</b>   Representação das situações de homoplasmia, heteroplasmia e dos efeitos de <i>threshold</i> e <i>bottleneck</i> .....	30
<b>Figura 4</b>   Mapa de morbilidade das mutações do genoma mitocondrial humano.....	32
<b>Figura 5</b>   Representação esquemática das etapas da preparação das bibliotecas genómicas. ....	43
<b>Figura 6</b>   <i>Pipeline</i> bioinformática. ....	44
<b>Figura 7</b>   Representação esquemática do protocolo de otimização da PCR. ....	47
<b>Figura 8</b>   Representação esquemática do protocolo de PCR de sequenciação. ....	48
<b>Figura 9</b>   Via metabólica do ácido propiónico. ....	53
<b>Figura 10</b>   Processamento intracelular da cobalamina. ....	54
<b>Figura 11</b>   Contexto estrutural e conservação evolutiva do resíduo de serina no codão 117 da proteína MECR. ....	57
<b>Figura 12</b>   Contexto estrutural e conservação evolutiva do resíduo de alanina no codão 360 da proteína VARS2.....	59
<b>Figura 13</b>   Eletroferograma das variantes identificadas no gene <i>NARS2</i> .....	62
<b>Figura 14</b>   Eletroferograma das variantes identificadas no gene <i>SURF1</i> .....	63
<b>Figura 15</b>   Eletroferograma da variante c.90C>A (p.Tyr30*) identificada em heterozigotia no cDNA do gene <i>DARS2</i> .....	64
<b>Figura 16</b>   Rede de interações genéticas associadas ao gene <i>DARS2</i> .....	65



# Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b>   Aminoacidopatias rastreadas no PNRN de Portugal. ....	15
<b>Tabela 2</b>   Acidúrias orgânicas rastreadas no PNRN de Portugal. ....	16
<b>Tabela 3</b>   Doenças do ciclo da ureia. ....	17
<b>Tabela 4</b>   Doenças mais comuns do metabolismo intermediário dos carboidratos. .	18
<b>Tabela 5</b>   Doenças da $\beta$ -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos rastreadas no PNRN de Portugal. ....	19
<b>Tabela 6</b>   Acidoses lácticas congénitas mais comuns. ....	20
<b>Tabela 7</b>   Glicogenoses mais comuns na Europa. ....	20
<b>Tabela 8</b>   Defeitos congénitos da glicosilação. ....	22
<b>Tabela 9</b>   Doenças lisossomais de sobrecarga mais comuns. ....	24
<b>Tabela 10</b>   Doenças peroxissomais mais comuns. ....	25
<b>Tabela 11</b>   Doenças mitocondriais associadas a variantes no genoma nuclear. ....	33
<b>Tabela 12</b>   Caracterização dos doentes. ....	41
<b>Tabela 13</b>   Preditores de patogenicidade ou de alteração do splicing utilizados. ....	45
<b>Tabela 14</b>   Primers utilizados para amplificar os genes <i>NARS2</i> , <i>SURF1</i> e <i>DARS2</i> a partir do cDNA. ....	46
<b>Tabela 15</b>   <i>Mix</i> e temperatura de <i>annealing</i> ótima. ....	47
<b>Tabela 16</b>   Variantes identificadas nos doentes estudados. ....	51
<b>Tabela 17</b>   Variante identificada em aparente homozigotia no gene <i>MCEE</i> . ....	53
<b>Tabela 18</b>   Variantes identificadas em heterozigotia no gene <i>TCN1</i> . ....	55
<b>Tabela 19</b>   Variante identificada em aparente homozigotia no gene <i>MECR</i> . ....	56
<b>Tabela 20</b>   Variantes identificadas em heterozigotia no gene <i>VARS2</i> . ....	58
<b>Tabela 21</b>   Variante identificada em aparente homozigotia no gene <i>SPG7</i> . ....	60
<b>Tabela 22</b>   Variante identificada em heterozigotia no gene <i>NARS2</i> . ....	61
<b>Tabela 23</b>   Variante identificada em heterozigotia no gene <i>SURF1</i> . ....	62
<b>Tabela 24</b>   Variante identificada em heterozigotia no gene <i>DARS2</i> . ....	64
<b>Tabela 25</b>   Variante identificada em heterozigotia no gene <i>KARS1</i> . ....	65

# Lista de abreviaturas

<b>SIGLA</b>	<b>Significado</b>
ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CDG	Defeitos congénitos da glicosilação
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CRM	Cadeia respiratória mitocondrial
DGH	Departamento de Genética Humana
DHM	Doenças hereditárias do metabolismo
DM	Doenças mitocondriais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DR	Doença(s) rara(s)
gDNA	Ácido desoxirribonucleico genómico
INSA	Instituto Nacional Doutor Ricardo Jorge
LHON	Neuropatia ótica hereditária de Leber
LS	Síndrome de Leigh
MELAS	Encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios similares a acidentes vasculares cerebrais
MERRF	Epilepsia mioclónica e fibras vermelhas rotas
MILS	Síndrome de Leigh de herança materna
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
mt-aARS	Aminoacil-tRNA sintetases mitocondriais
mtDNA	Genoma mitocondrial
NARP	Neuropatia com ataxia e retinite pigmentosa
nDNA	Genoma nuclear
NGS	Sequenciação de Nova Geração
NMD	<i>Nonsense Mediated Decay</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OXPHOS	Fosforilação oxidativa
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PNRN	Programa Nacional de Rastreio Neonatal
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
TCA	Ciclo do ácido tricarbóxico
tRNA	Ácido ribonucleico de transferência
URN	Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética
WES	Sequenciação do exoma inteiro
WGS	Sequenciação do genoma inteiro

# **Capítulo 1**

---

## **Contextualização do estágio**



O Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) foi fundado em 1899 para servir a missão de laboratório do sistema nacional de saúde. Atualmente, desenvolve atividades como laboratório do Estado no sector da saúde, laboratório nacional de referência e observatório nacional de saúde. Possui vários departamentos, um dos quais o Departamento de Genética Humana (DGH), que desenvolve atividades tanto no âmbito da investigação e desenvolvimento como no âmbito da prestação de serviços nas áreas de genética molecular humana, citogenética e bioquímica genética.

A Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética (URN) do INSA é o local onde são realizados os testes laboratoriais do Plano Nacional de Rastreio Neonatal, designados popularmente como “testes do pezinho”. Este laboratório assume a responsabilidade de efetuar o rastreio neonatal de todos os bebés nascidos em Portugal efetuando, por dia, o rastreio de cerca de 350 recém-nascidos e tendo atualmente uma taxa de cobertura de nascimentos superior a 99% (Marcão *et al.*, 2017).

Esta unidade, também é uma unidade de referência para o diagnóstico molecular de doenças metabólicas e citopatias mitocondriais, disponibilizando por rotina inúmeros estudos moleculares, entre eles a análise por Sequenciação de Nova Geração (NGS, *Next-Generation Sequencing*) de painéis de genes candidatos associados a doenças mitocondriais e a doenças metabólicas, entre outros. Disponibiliza ainda a análise do mtDNA completo por NGS.

Quando a causa genética dos doentes estudados não é identificada, a investigação prossegue com o estudo do exoma clínico / mendelioma, que inclui um total de 5227 genes já associados a doença (Anexo 1), e que foi o objeto de estudo deste trabalho.



# **Capítulo 2**

---

## **Introdução**





## 2.1 Doenças Raras

### 2.1.1 Conceito e Prevalência

As doenças raras (DR) são doenças que afetam apenas uma pequena percentagem da população (Pogue *et al.*, 2018). A Organização Mundial de Saúde define como DR qualquer doença cuja prevalência seja inferior a 6,5 - 10 por 10.000 indivíduos (Derayeh *et al.*, 2018). No entanto, esta prevalência tende a variar conforme a localização geográfica. Na União Europeia, define-se como DR a doença cuja prevalência é inferior a 5 por cada 10.000 indivíduos, o que equivale a 1 indivíduo afetado a cada 2.000 habitantes (Richter *et al.*, 2015). Já nos Estados Unidos da América, as DR afetam menos de 200.000 indivíduos (1 a cada 1.500 habitantes), enquanto que no Japão e na Coreia do Sul, estas afetam menos de 50.000 e 20.000 indivíduos, respetivamente (1 a cada 2.500 habitantes) (Aronson, 2006; Rubinstein *et al.*, 2020).

Ainda assim, estudos recentes indicam que cerca de 3,5 a 5,9% da população mundial, ou seja, cerca de 300 milhões de indivíduos, é portadora de uma DR (Wakap *et al.*, 2020). Em Portugal, estima-se que existam 600 mil a 800 mil portadores destas doenças, afetando cerca de 6 a 8% da população nacional (Nogueira *et al.*, 2019a).

A prevalência das DR também pode variar conforme o grupo étnico / subpopulacional. Um exemplo clássico é a doença de Tay–Sachs, que apesar de rara na população geral, é muito comum na população de judeus asquenazes, afetando 1 a cada 25 indivíduos (Haendel *et al.*, 2020). Outro exemplo é a prevalência de indivíduos com drepanocitose na população da África subsariana, que afeta 1 a cada 300 recém-nascidos (Kawuki *et al.*, 2019).

Para além da sua prevalência, as DR são ainda classificadas como doenças crónicas, por vezes com clínica intrincada e heterogénea, degenerativas, incapacitantes e por vezes fatais. Mais de metade dos casos são diagnosticados em crianças (antes dos 2 anos de idade) e muitas destas doenças não possuem tratamento eficaz. Apesar disso, se diagnosticadas precocemente e se tiverem opções terapêuticas disponíveis, algumas destas doenças podem ser compatíveis com uma boa qualidade de vida e um bom desenvolvimento intelectual e funcional (Derayeh *et al.*, 2018; Lochmüller *et al.*, 2017).

## 2.1.2 Diagnóstico

Segundo a literatura, estão descritas mais de 7.000 DR (Haendel *et al.*, 2020). Aproximadamente 80% destas têm etiologia genética, sendo as restantes provocadas por infeções virais / bacterianas, processos autoimunes ou então por processos degenerativos e tóxicos devido à exposição a produtos químicos ou radiações (Lochmüller *et al.*, 2017).

Cerca de 65% das DR tem uma expressão clínica grave, multissistémica e debilitante, estando metade destes casos associados a deficiências motoras, sensoriais e intelectuais que comprometem a autonomia do doente (Ministère des Solidarités et de la Santé, 2018). O prognóstico destes doentes é reservado, revelando uma taxa de mortalidade de 35% antes dos 12 meses de vida, 10% entre os 1 e os 5 anos e 12% entre os 5 e os 15 anos (World Health Organization, 2013).

O diagnóstico das DR ainda apresenta grandes dificuldades. Devido à falta de formação adequada por parte dos médicos, aliada à variabilidade fenotípica das DR, muitos dos doentes não são encaminhados para serviços especializados ou centros de referência mais adequados, atrasando o diagnóstico destas patologias (Stoller, 2018). Segundo a literatura, após o aparecimento dos primeiros sintomas, cerca de 25% dos doentes espera entre 5 a 30 anos para ter um diagnóstico definitivo (Nogueira *et al.*, 2019a). Estes atrasos no diagnóstico levam consequentemente à prescrição de tratamentos e medicação inadequada ou ainda à transmissão da mesma patologia à geração seguinte (C. Ferreira, 2019).

Devido às dificuldades no diagnóstico e investigação das DR, foi estabelecida em Portugal a Comissão Interministerial para a implementação da Estratégia Integrada para as Doenças Raras 2015-2020, cujos objetivos incidiam na "*melhoria da coordenação dos cuidados de saúde; na promoção de unidades de investigação, de acesso ao diagnóstico precoce e tratamentos; e no desenvolvimento de programas de formação e treino a profissionais de saúde e do sector social*" (Despacho n.º 2129-B/2015). Adicionalmente, com o objetivo de promover o conhecimento e de sensibilizar a sociedade para os desafios causadas pelas DR comemora-se, no último dia de fevereiro, o Dia Mundial das Doenças Raras que é coordenado pela EURORDIS (*European Organisation for Rare Diseases*), uma organização não-governamental sem fins lucrativos distribuída por mais de 60 países e que reúne mais de 700 associações (Serviço Nacional de Saúde, 2020).

Nos últimos anos, devido ao desenvolvimento das tecnologias de NGS e ao desenvolvimento de *pipelines* bioinformáticas para a análise dos respetivos dados, o número de genes e de variantes associadas a uma DR tem aumentado rapidamente (Pogue *et al.*, 2018). Em janeiro de 2022, segundo a *Orphadata* (<http://www.orphadata.org/>), estavam listados 3.884 genes diferentes associados a DR e, segundo a OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*, <https://www.omim.org/>), já estão registados 7.094 diferentes fenótipos cuja base molecular é conhecida. Aliado ao facto de que a grande maioria das DR tem origem genética, estes dados tornam evidentes a importância do diagnóstico molecular deste tipo de doenças (Jackson *et al.*, 2018).

Os testes moleculares são bastante úteis no esclarecimento da etiologia molecular da maioria das alterações cromossómicas e das doenças monogénicas, permitindo também fazer o diagnóstico de certas doenças poligénicas e epigenéticas. Devido ao enorme tamanho do genoma humano, atualmente, grande parte do diagnóstico molecular baseia-se na análise das sequências exónicas e das respetivas regiões intrónicas flanqueadoras, apesar destas constituírem apenas cerca de 2% do genoma total (Smith *et al.*, 2015). No entanto, é importante notar que variantes que afetam sequências presentes em regiões não codificantes do DNA, cuja função esteja envolvida na regulação da expressão e no silenciamento de genes, podem também estar na causa de algumas DR (Sirmaci *et al.*, 2012).

Dentro das várias metodologias existentes, num laboratório de genética molecular, destacam-se quatro técnicas que são rotineiramente utilizadas: a *Polymerase chain reaction* (PCR), a sequenciação automática pelo método de Sanger, a *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) e a NGS.

A NGS surgiu como alternativa à técnica de sequenciação de Sanger e tem-se tornado a técnica mais utilizada no diagnóstico de doenças raras. A NGS é particularmente eficaz para a análise de doenças com clínica complexa e heterogénea, em que um grande número de genes pode ser investigado em simultâneo (Legati *et al.*, 2016). Para isso, uma grande variedade de metodologias pode ser implementada, desde a sequenciação dirigida a painéis de genes candidatos, a sequenciação do exoma clínico / mendelioma (com cerca de 6000 genes relevantes) até à sequenciação do exoma ou genoma completo (WES – *Whole Exome Sequencing* e WGS – *Whole Genome Sequencing*, respetivamente) (Nogueira *et al.*, 2019b).

Esta técnica de sequenciação massiva veio reduzir o tempo e os custos do diagnóstico molecular, tendo um papel importante não só num diagnóstico genético mais eficiente,

num aconselhamento genético mais preciso, na escolha adequada de opções pré-natais como também na compreensão da fisiopatologia das próprias doenças e, portanto, na definição das opções terapêuticas (Hu *et al.*, 2021).

### 2.1.3 Programa Nacional de Rastreio Neonatal

Uma das formas de realizar o diagnóstico precoce de algumas DR é através do rastreio neonatal, ou seja, testes bioquímicos e moleculares realizados após o nascimento dos bebés e antes do aparecimento da sintomatologia, em que o tratamento precoce permite evitar a evolução da doença, normalmente genética, e promover a melhoria do estado de saúde (Cornel *et al.*, 2021).

Assim, em 1979, foi fundado em Portugal por iniciativa do Doutor Jacinto de Magalhães, o Programa Nacional de Diagnóstico Precoce, renomeado em 2019 para Programa Nacional de Rastreio Neonatal (PNRN) sob orientação da Doutora Laura Vilarinho (F. Ferreira *et al.*, 2020). Inicialmente, este programa começou com o rastreio neonatal de patologias como a fenilcetonúria e o hipotireoidismo congénito, sendo posteriormente alargado a mais 23 doenças hereditárias do metabolismo e também à fibrose cística (Vilarinho *et al.*, 2021). Mais recentemente, em maio de 2021, deu início o estudo piloto para incluir a drepanocitose no painel de doenças rastreadas no âmbito do PNRN, estando também em fase de preparação o estudo piloto para o rastreio da atrofia muscular espinhal, com previsão de iniciar ainda no ano de 2022.

O rastreio é realizado em todos os hospitais do país e também nos centros de saúde, preferencialmente entre o 3º e o 6º dia de vida, através da colheita de uma amostra de sangue do calcanhar do bebé para os cartões de *Guthrie*. A sua realização não tem custos para os pais e, apesar de não ser obrigatória, é altamente benéfica, uma vez que permite diagnosticar doenças graves cujo tratamento precoce é vantajoso (INSA, 2020).

### 2.1.4 Tratamento

Devido à raridade e à diversidade das DR, existe uma grande dificuldade na implementação de projetos de investigação, necessários para o desenvolvimento de terapias e medicamentos essenciais ao tratamento destes doentes (Direcção-Geral da Saúde, 2008). Apesar dos recentes avanços na investigação das opções de tratamento, cerca de 90% dos doentes com uma DR não tem até agora nenhum tratamento eficaz disponível (Boycott e Ardigò, 2018). Outra dificuldade baseia-se no facto de existir um

grande número de genes associados às DR, estando cerca de 30% destes genes associados a mais do que uma DR. É assim essencial esclarecer a heterogeneidade clínica, a expressão e penetrância variável e ainda possíveis interações epistáticas destas doenças, de modo a auxiliar o desenvolvimento de novas terapias (Austin *et al.*, 2018; Boycott e Ardigò, 2018).

Nos dias de hoje, estão disponíveis 4 estratégias diferentes para o tratamento das DR: as terapias de substituição enzimática e restrição dietética, os medicamentos órfãos e mais recentemente as terapias celulares e as terapias génicas (Pogue *et al.*, 2018).

#### **2.1.4.1 Terapias de substituição enzimática e restrição dietética**

As terapias de substituição enzimática e restrição dietética foram as primeiras formas de tratamento de algumas DR, nomeadamente as doenças hereditárias do metabolismo, em que há a perda de função de determinada proteína (Tambuyzer *et al.*, 2020; Tarailo-Graovac *et al.*, 2016). Dentre estas, destaca-se a fenilcetonúria, uma patologia que resulta da deficiência da enzima fenilalanina hidroxilase, que converte a fenilalanina em tirosina (van Wegberg *et al.*, 2017). Aqui, a restrição dietética de alimentos contendo fenilalanina é muito eficaz se for implementada antes dos 23 dias de vida do bebé, possibilitando muitas vezes aos doentes terem uma qualidade de vida completamente normal (Jackson *et al.*, 2018).

Outro exemplo é o caso da hipofosfatasia, que é caracterizada por baixos níveis séricos da enzima fosfatase alcalina. Consequentemente, há acumulação de fosfato inorgânico, que leva ao aparecimento de defeitos ósseos e uma fraca mineralização dos dentes (S. Simon *et al.*, 2018). O tratamento desta patologia consiste em terapias de substituição enzimática, onde a administração de asfotase alfa, uma enzima recombinante que possui um domínio catalítico de fosfatase alcalina, permite controlar os níveis de fosfato inorgânico (Whyte *et al.*, 2012).

#### **2.1.4.2 Medicamentos órfãos**

Os medicamentos órfãos são medicamentos dirigidos ao tratamento de DR (Attwood *et al.*, 2018). Até aos dias atuais, estão descritos na Europa cerca de 200 medicamentos órfãos (Hendrickx e Dooms, 2021). Devido à escassez da população alvo para estes medicamentos, a sua produção e distribuição não é muitas vezes rentável, o que leva à maioria destes medicamentos custar, em média, 5 vezes mais que os medicamentos normais (C. Ferreira, 2019). Por outro lado, uma vez que existe um conhecimento muito

limitado sobre a maioria das DR e um baixo número de indivíduos que podem ser estudados (Fonseca *et al.*, 2019), o processo de desenvolvimento destes medicamentos pode demorar mais de 10 anos e é muitas vezes incerto, visto que em média, de 10 moléculas estudadas, apenas uma tem efeito terapêutico. Apesar disto, a União Europeia tem implementado estratégias de investimento e incentivo ao desenvolvimento de medicamentos órfãos (Orphanet, 2017).

#### **2.1.4.3 Terapia celular**

As terapias celulares consistem na utilização de células estaminais ou de células pluripotentes induzidas para corrigir defeitos de determinadas linhas celulares. Isto pode ser efetuado através de transplantes alogénicos, onde são transplantadas células de um dador saudável compatível, ou então por transplantes autólogos, onde as próprias células do doente são colhidas e manipuladas, sendo depois transplantadas de novo no mesmo doente (Tambuyzer *et al.*, 2020).

A utilização de células estaminais é eficaz em doenças hematológicas raras, como a síndrome da imunodeficiência combinada grave (Aiuti *et al.*, 2017). Outro exemplo é o transplante de células pluripotentes induzidas, como células manipuladas da retina, no tratamento de problemas oculares raros (F. Chen *et al.*, 2014).

#### **2.1.4.4 Terapia génica**

Uma estratégia para realizar o tratamento permanente de algumas DR é a terapia génica. As terapias génicas visam corrigir as sequências genéticas responsáveis por determinada DR, através da substituição das sequências mutadas ou através da inserção de cópias normais de determinados genes no genoma do doente (Naldini, 2015). No entanto, para serem bem-sucedidas, as terapias génicas necessitam de veículos eficientes para entregar as novas informações genéticas a uma percentagem considerável de células. Atualmente, os vetores virais adeno-associados, os vetores  $\gamma$ -retrovirais / lentivirais e ainda complexos de edição genómica têm demonstrado resultados promissores (Dunbar *et al.*, 2018).

Relativamente aos vetores virais, os vetores virais adeno-associados têm sido usados em ensaios clínicos para o tratamento de DR como a deficiência familiar da lipoproteína lípase ácida, a hemofilia A e a hemofilia B; enquanto que vetores  $\gamma$ -retrovirais ou lentivirais têm sido usados em ensaios clínicos para o tratamento de patologias como a

síndrome da imunodeficiência combinada grave, a  $\beta$ -talassemia, a adrenoleucodistrofia ligada ao X e a síndrome de *Wiskott-Aldrich* (Tambuyzer *et al.*, 2020).

Mais recentemente, o aparecimento de ferramentas de edição genómica como as nucleases com efetores do tipo ativador transcricional (TALENs), as nucleases *zinc finger* (ZFNs) e ainda os *clustered regularly interspaced short palindromic repeat systems* (CRISPR-Cas) têm demonstrado cada vez mais resultados positivos na correção específica de mutações causadoras de doenças (Pogue *et al.*, 2018).

É importante notar que pequenos RNAs de interferência também estão a ser clinicamente testados para silenciar genes defeituosos, nomeadamente com ganho de função, por reduzirem a quantidade de RNAs mensageiros alvo. Este tipo de estratégia tem demonstrado resultados promissores no tratamento de condições neurológicas raras (Rinaldi e Wood, 2018).

## 2.1.5 Importância do aconselhamento genético

O aconselhamento genético é também um processo essencial quando se fala de uma DR. Este é concebido para minimizar as consequências associadas ao diagnóstico de uma DR, comunicando ao doente e aos seus familiares a sua ocorrência e possíveis riscos de recorrência (Paneque *et al.*, 2019). Durante este processo, os doentes e os seus familiares são auxiliados quanto à compreensão das características clínicas e o provável curso da doença, as opções de tratamento e os ensaios clínicos disponíveis, tudo com vista na promoção da saúde e na minimização dos danos psicológicos (Pina-Neto, 2008).

Outra atividade importante do aconselhamento genético é a prevenção da recorrência da mesma doença na família, nomeadamente em situações de consanguinidade e de infertilidade, oferecendo alternativas de reprodução como o diagnóstico pré-natal ou pré-implantatório (Geraedts, 2017).

## 2.2 Doenças Hereditárias do Metabolismo

As doenças hereditárias do metabolismo (DHM), também designadas como erros inatos do metabolismo, são um grupo de doenças genéticas que causam o comprometimento de determinada via metabólica (Ebrahimi-Fakhari *et al.*, 2019). Atualmente estão descritas mais de 700 DHM e, embora cada doença seja individualmente rara, coletivamente, as DHM podem atingir uma prevalência até 1 em cada 800 indivíduos (Balakrishnan, 2021).

O mecanismo de patogénese das DHM deve-se a defeitos enzimáticos ou de outras moléculas que originam a acumulação de substratos tóxicos, deficiências de metabolitos biologicamente ativos ou ainda o desvio de determinado substrato para uma via metabólica alternativa (C. Ferreira e van Karnebeek, 2019). A maioria destas doenças tem manifestação clínica ainda no período neonatal, em que os primeiros sinais e sintomas ocorrem horas ou dias após o nascimento (El-Hattab, 2015), sendo ainda responsáveis por grande parte da mortalidade neonatal (Waters *et al.*, 2018).

O diagnóstico das DHM é muitas vezes desafiante, uma vez que muitas destas patologias afetam mais do que um órgão e possuem uma apresentação clínica inespecífica (Kruszka e Regier, 2019). Além disso, a maioria destas são transmitidas de um modo autossómico recessivo, daí a importância de esclarecer a história familiar de consanguinidade parental e se existe algum irmão ou familiar com a mesma apresentação clínica (El-Hattab, 2015). Laboratorialmente, este diagnóstico é efetuado em múltiplos níveis, tanto pela análise bioquímica de substratos, metabolitos e atividades enzimáticas, como pela análise molecular (Guerrero *et al.*, 2018).

Funcionalmente, as DHM podem ser divididas em 3 grupos diferentes: i) Doenças do metabolismo intermediário envolvendo moléculas pequenas; ii) Doenças do metabolismo energético primário e iii) Doenças envolvendo moléculas complexas (Saudubray e Garcia-Cazorla, 2018).

### 2.2.1 Doenças do metabolismo intermediário

Define-se como metabolismo intermediário todas as reações bioquímicas de anabolismo (biossíntese) ou catabolismo (degradação) que permitem converter nutrientes provenientes da alimentação e da respiração em componentes celulares (Veerappa e McClure, 2020). Neste processo estão envolvidas milhares de proteínas, a maioria enzimas e transportadores celulares, cujo défice origina a acumulação (aguda ou crónica progressiva) de um substrato tóxico (Ezgu, 2016).



Neste grupo, incluem-se doenças como as aminoacidopatias, as acidúrias orgânicas, as porfirias, os defeitos do ciclo da ureia, defeitos do metabolismo intermediário dos carboidratos, defeitos do metabolismo de purinas e pirimidinas, defeitos da biossíntese de vitaminas e cofatores, defeitos do metabolismo de neurotransmissores e ainda defeitos do metabolismo de metais (Saudubray e Garcia-Cazorla, 2018).

### 2.2.1.1 Aminoacidopatias

As aminoacidopatias devem-se a defeitos no metabolismo de aminoácidos, que resultam na sua acumulação (ou dos seus metabolitos intermediários) na corrente sanguínea e na urina (Rice e Steiner, 2016). Apesar do diagnóstico molecular poder ser realizado, a abordagem bioquímica por espectrometria de massa em *tandem* revelou-se mais eficaz, uma vez que permite a obtenção rápida e simultânea da concentração de diferentes aminoácidos. Não obstante, o diagnóstico bioquímico é sempre confirmado molecularmente (Ozben, 2013).

Em Portugal, estima-se que as aminoacidopatias têm uma prevalência de 1 a cada 5.000 indivíduos (Rocha *et al.*, 2021). Na tabela 1, estão descritas a prevalência, os genes causais e as enzimas em défice das aminoacidopatias rastreadas no PNRN de Portugal.

**Tabela 1** | Aminoacidopatias rastreadas no PNRN de Portugal.

Aminoacidopatia	Prevalência em Portugal	Gene(s)	Enzima em défice	Referência
Fenilcetonúria	1:10.929	<i>PAH</i>	Fenilalanina hidroxilase	(Rocha <i>et al.</i> , 2021; van Wegberg <i>et al.</i> , 2017)
Hipermetioninemia	1:32.030	<i>MAT1A</i> ou <i>MAT2A</i>	Metionina adenosiltransferase	(Barić <i>et al.</i> , 2017; Rocha <i>et al.</i> , 2021)
Leucínose	1:89.227	<i>BCKDHA</i> , <i>BCKDHB</i> ou <i>DBT</i>	Complexo $\alpha$ -cetoácido desidrogenase das cadeias ramificadas	(Blackburn <i>et al.</i> , 2017; Rocha <i>et al.</i> , 2021)
Tirosinemia tipo I	1:208.196	<i>FAH</i>	Fumarilacetoacetato hidrolase	(Chinsky <i>et al.</i> , 2017; Rocha <i>et al.</i> , 2021)
Tirosinemia tipo II	1:312.294	<i>TAT</i>	Tirosina aminotransferase	(Locatelli <i>et al.</i> , 2017; Rocha <i>et al.</i> , 2021)
Tirosinemia tipo III		<i>HPD</i>	4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase	(Barroso <i>et al.</i> , 2020; Rocha <i>et al.</i> , 2021)
Homocistinúria clássica	1:624.588	<i>CBS</i>	Cistationina $\beta$ -sintetase	(Bublil e Majtan, 2020; Rocha <i>et al.</i> , 2021)

### 2.2.1.2 Acidúrias orgânicas

As acidúrias orgânicas são provocadas por defeitos no metabolismo dos aminoácidos, carboidratos e lípidos que originam a acumulação de ácidos orgânicos nos tecidos e sua consequente excreção na urina (Reddy *et al.*, 2018). Devem-se a defeitos das enzimas mitocondriais que permitem metabolizar ácidos carboxílicos ligados à coenzima-A, originando um quadro de acidose metabólica (C. Ferreira *et al.*, 2021).

Tal como as aminoacidopatias, as acidúrias orgânicas fazem parte do PNRN e o seu rastreio é efetuado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, estimando-se que a sua prevalência seja igual a 1 a cada 14.036 habitantes (Rocha *et al.*, 2021). Na tabela 2, estão descritas a prevalência, os genes e as enzimas envolvidas nas acidúrias orgânicas rastreadas no PNRN de Portugal.

**Tabela 2** | Acidúrias orgânicas rastreadas no PNRN de Portugal.

Acidúria orgânica	Prevalência em Portugal	Gene(s)	Enzima em défice	Referência
3-Metilcrotonilglicinúria	1:43.075	<i>MCCC1</i> ou <i>MCCC2</i>	3-metilcrotonil-CoA carboxilase	(Grünert <i>et al.</i> , 2012; Rocha <i>et al.</i> , 2021)
Acidúria Metilmalónica tipo mut-	1:52.049	<i>MMUT</i>	Metilmalonil-CoA mutase	(Baumgartner <i>et al.</i> , 2014; Rocha <i>et al.</i> , 2021)
Acidúria Glutárica tipo I	1:78.073	<i>GCDH</i>	Glutaril-CoA desidrogenase	(Boy <i>et al.</i> , 2017; Rocha <i>et al.</i> , 2021)
Acidúria 3-Hidroximetilglutárica	1:124.918	<i>HMGCL</i>	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liase	(Jones <i>et al.</i> , 2020; Rocha <i>et al.</i> , 2021)
Acidúria Isovalérica	1:249.835	<i>IVD</i>	Isovaleril-CoA desidrogenase	(Rocha <i>et al.</i> , 2021; Schlune <i>et al.</i> , 2018)
Acidúria Propiónica	1:416.392	<i>PCCA</i> ou <i>PCCB</i>	Propionil-CoA carboxilase	(Baumgartner <i>et al.</i> , 2014; Rocha <i>et al.</i> , 2021)
Acidúria Malónica	1:624.588	<i>MLYCD</i>	Malonil-CoA descarboxilase	(Baertling <i>et al.</i> , 2014; Rocha <i>et al.</i> , 2021)

### 2.2.1.3 Defeitos do ciclo da ureia

O ciclo da ureia é o principal mecanismo envolvido no metabolismo de compostos nitrogenados, resultantes do metabolismo das proteínas, através da conversão de amónia em ureia e da síntese de arginina (Judge e Dodd, 2020). Por esta razão, defeitos nas enzimas deste ciclo resultam na acumulação de amónia, um composto tóxico, ou de outros metabolitos como a arginina (Matsumoto *et al.*, 2019).

Os defeitos do ciclo da ureia, descritos na tabela 3, estão relacionados com défices em enzimas intervenientes neste ciclo ou então com a deficiência de transportadores mitocondriais de certos aminoácidos (Matsumoto *et al.*, 2019).

**Tabela 3** | Doenças do ciclo da ureia.

Defeito do ciclo da ureia	Prevalência	Gene	Proteína em défice	Referência
Citrulinemia tipo I	1:124.918 (em Portugal)	<i>ASS1</i>	Argininossuccinato sintetase	(Rocha <i>et al.</i> , 2021; Zielonka <i>et al.</i> , 2019)
Acidúria Argininossuccínica	1:178.454 (em Portugal)	<i>ASL</i>	Argininossuccinato liase	(Baruteau <i>et al.</i> , 2019; Rocha <i>et al.</i> , 2021)
Hiperargininemia	1:178.454 (em Portugal)	<i>ARG1</i>	Arginase I	(Cornelius <i>et al.</i> , 2020; Rocha <i>et al.</i> , 2021)
Deficiência de OTC	1:35.000 a 1:62.000	<i>OTC</i>	Ornitina transcarbamilase	(Batshaw <i>et al.</i> , 2014; Caldovic <i>et al.</i> , 2015; Keskinen <i>et al.</i> , 2008)
Citrulinemia tipo II	1:100.000 a 1:230.000 *	<i>SLC25A13</i>	Transportador de aspartato-glutamato	(Kobayashi <i>et al.</i> 2006)
Deficiência de CPSI	1:539.000 a 1:1.300.000	<i>CPS1</i>	Carbamoil-fosfato sintetase	(Keskinen <i>et al.</i> , 2008; Martínez <i>et al.</i> , 2010; Summar <i>et al.</i> , 2013)
Deficiência de NAGS	1:2.000.000	<i>NAGS</i>	N-acetilglutamato sintetase	(Kenneson e Singh, 2020; Summar <i>et al.</i> , 2013)
Síndrome HHH	< 1:2.000.000	<i>SLC25A15</i>	Transportador de citrulina-ornitina	(Martinelli <i>et al.</i> , 2015; Summar <i>et al.</i> , 2013)

\* Prevalência apenas reportada em países asiáticos, onde é mais comum. HHH: Hiperornitinemia-hiperamoniemia-homocitrulinemia.

#### 2.2.1.4 Defeitos do metabolismo intermediário dos carboidratos

Os carboidratos são classificados em três grupos principais: monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (Judge e Dodd, 2020). Defeitos enzimáticos no metabolismo de monossacarídeos e oligossacarídeos resultam na acumulação de metabolitos intermediários tóxicos, que originam quadros de hipoglicemia, disfunção hepática e miopatia (Ezgu, 2016).

Na tabela 4, estão expostas as doenças mais comuns do metabolismo de monossacarídeos e dissacarídeos. As glicogenoses serão abordadas posteriormente, uma vez que o glicogénio possui uma importante função no metabolismo energético.

**Tabela 4** | Doenças mais comuns do metabolismo intermediário dos carboidratos.

Doença do metabolismo dos carboidratos	Prevalência europeia	Gene	Enzima em défice	Referência
Intolerância hereditária à frutose	1:20.000	<i>ALDOB</i>	Frutose-1-fosfato aldolase	(Orphanet Report Series, 2022; Pinheiro <i>et al.</i> , 2021)
Galactosemia clássica	1:50.000	<i>GALT</i>	Galactose-1-fosfato uridiltransferase	(Orphanet Report Series, 2022; Welling <i>et al.</i> , 2017)
Alactasia congénita	1:60.000 *	<i>LCT</i>	Lactase	(Coromina <i>et al.</i> , 2015; Järvelä <i>et al.</i> , 2009)

\* Prevalência apenas reportada na Finlândia, local do continente europeu onde é mais comum.

## 2.2.2 Doenças do metabolismo energético

As doenças do metabolismo energético afetam a capacidade de um indivíduo produzir moléculas altamente energéticas como a adenosina trifosfato – ATP (Cox, 2013). Aqui, a patogénese decorre da deficiência do produto, causando sintomas em órgãos metabolicamente ativos como o músculo esquelético, o músculo cardíaco e o cérebro (Kwon, 2018).

Neste grupo, incluem-se doenças como as acidoses lácticas congénitas; as doenças mitocondriais; os defeitos na cetogénese e na  $\beta$ -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos; as glicogenoses; os defeitos na glicólise, gliconeogénese e transporte da glicose, assim como os defeitos do metabolismo da creatina (Saudubray e Garcia-Cazorla, 2018).

### 2.2.2.1. Defeitos na $\beta$ -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos

Os ácidos gordos são transportados para as mitocôndrias onde são catabolizados por  $\beta$ -oxidação a fim de produzirem moléculas de acetil-CoA, passíveis de serem utilizadas no ciclo do ácido tricarbóxico (TCA) / ciclo de Krebs (Judge e Dodd, 2020). Defeitos nas enzimas e nos transportadores envolvidos neste processo resultam no consumo de glicose, havendo um quadro clínico de hipoglicemia hipocetótica, razão pela qual os doentes afetados por estas patologias devem evitar jejuns prolongados (El-Hattab, 2015).

Em Portugal, este grupo de DHM (tabela 5), tal como as aminoacidopatias, é dos mais comuns, apresentando uma prevalência estimada de 1 a cada 6.000 indivíduos (Rocha *et al.*, 2021).

**Tabela 5** | Doenças da  $\beta$ -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos rastreadas no PNRN de Portugal.

<b>Doença da <math>\beta</math>-oxidação mitocondrial dos ácidos gordos</b>	<b>Prevalência em Portugal</b>	<b>Gene(s)</b>	<b>Proteína em défice</b>	<b>Referência</b>
Défice da desidrogenase dos ácidos gordos de cadeia média (MCAD)	1:7.525	<i>ACADM</i>	Desidrogenase dos ácidos gordos de cadeia média	(Anderson <i>et al.</i> , 2020; Rocha <i>et al.</i> , 2021)
Défice da desidrogenase de 3-hidroxi-acil CoA de cadeia longa (LCHAD)	1:96.090	<i>HADHA</i>	Desidrogenase de 3-hidroxi-acil CoA de cadeia longa	(H. Fraser <i>et al.</i> , 2019; Rocha <i>et al.</i> , 2021)
Défice da desidrogenase dos ácidos gordos de cadeia muito longa (VLCAD)	1:124.918	<i>ACADVL</i>	Desidrogenase dos ácidos gordos de cadeia muito longa	(Rocha <i>et al.</i> , 2021; Rovelli <i>et al.</i> , 2019)
Défice primário em carnitina (CUD)	1:124.918	<i>SLC22A5</i>	Transportador da carnitina livre	(Frigeni <i>et al.</i> , 2017; Rocha <i>et al.</i> , 2021)
Défice múltiplo das desidrogenases dos ácidos gordos (MADD) / Acidúria glutárica do tipo II	1:138.797	<i>ETFA</i> , <i>ETFB</i> ou <i>ETFDH</i>	Desidrogenases dos ácidos gordos	(Henriques <i>et al.</i> , 2019; Rocha <i>et al.</i> , 2021)
Défice da carnitina-palmitoil transferase I	1:416.392	<i>CPT1A</i>	Carnitina-palmitoil transferase I	(Almannai <i>et al.</i> , 2019; Rocha <i>et al.</i> , 2021)
Défice da carnitina-palmitoil transferase II	1:416.392	<i>CPT2</i>	Carnitina-palmitoil transferase II	(Almannai <i>et al.</i> , 2019; Rocha <i>et al.</i> , 2021)
Défice da desidrogenase de 3-hidroxi-acil CoA de cadeia curta (SCHAD)	1:624.588	<i>HADH</i>	Desidrogenase de 3-hidroxi-acil CoA de cadeia curta	(Martins <i>et al.</i> , 2011; Rocha <i>et al.</i> , 2021)

### 2.2.2.2 Acidoses lácticas congénitas

As acidoses lácticas primárias são alterações no metabolismo do piruvato e do ciclo do TCA que resultam em acidose metabólica, uma vez que levam à acumulação do piruvato que é posteriormente convertido em ácido láctico (Ezgu, 2016).

Neste grupo, destaca-se o défice de piruvato carboxilase, uma enzima importante no ciclo do TCA e na gliconeogénese, e o défice de subunidades enzimáticas do complexo piruvato desidrogenase, onde 84% dos casos se deve a mutações no gene *PDHA1* (C. Ferreira e van Karnebeek, 2019).

A prevalência, os genes causais e as enzimas associadas às acidoses lácticas congénitas mais comuns estão descritas na tabela 6.

**Tabela 6** | Acidoses lácticas congénitas mais comuns.

Acidose láctica congénita	Prevalência	Gene(s)	Enzimas em défice	Referência
Défice de piruvato carboxilase	1: 200.000 (na Europa)	<i>PC</i>	Piruvato carboxilase	(C. Ferreira e van Karnebeek, 2019; Orphanet Report Series, 2022)
Défice do complexo piruvato desidrogenase	1: 790.000 (em Portugal)	<i>PDHA1</i> ou <i>PDHB</i>	Piruvato desidrogenase subunidade E1	(C. Ferreira e van Karnebeek, 2019; Pavlu-Pereira <i>et al.</i> , 2020)
		<i>DLAT</i>	Piruvato desidrogenase subunidade E2	
		<i>DLA</i>	Piruvato desidrogenase subunidade E3	
		<i>PDHX</i>	Piruvato desidrogenase <i>binding protein</i>	
		<i>PDP1</i>	Piruvato desidrogenase fosfatase	

### 2.2.2.3. Glicogenoses

As glicogenoses, também denominadas de doenças do armazenamento do glicogénio, são um grupo de doenças causadas por defeitos em enzimas envolvidas na síntese ou na degradação do glicogénio (Molares-Vila *et al.*, 2021). O glicogénio permite controlar a glicemia e atua como uma reserva de energia, uma vez que fornece glicose às células (e principalmente ao cérebro) na sua ausência. O tecido hepático e o tecido muscular são os dois tecidos onde ocorre o armazenamento primário de glicogénio, sendo estes os principais órgãos afetados nestas patologias (Kanungo *et al.*, 2018).

Já estão descritos 15 tipos diferentes de glicogenoses, algumas com mais do que um subtipo (por exemplo, a glicogenose do tipo I tem os subtipos *a* e *b*) (Kilimann e Oldfors, 2015). No entanto, na Europa, dá-se ênfase a 5 tipos com maior prevalência, descritos na tabela 7.

**Tabela 7** | Glicogenoses mais comuns na Europa.

Glicogenose	Prevalência europeia	Gene(s)	Proteína em défice	Referência
Glicogenose tipo Ia (doença de von Gierke)	1: 100.000	<i>G6PC</i>	Glicose-6-fosfatase	(Kishnani <i>et al.</i> , 2014; Orphanet Report Series, 2022)
Glicogenose tipo II (doença de Pompe) *	1: 40.000	<i>GAA</i>	$\alpha$ -1,4-glicosidase ácida lisossomal	(Kohler <i>et al.</i> , 2018; Orphanet Report Series, 2022)

Glicogenose	Prevalência europeia	Gene(s)	Proteína em défice	Referência
Glicogenose tipo III (doença de Cori-Forbes)	1: 100.000	<i>AGL</i>	Enzima desramificante do glicogénio (Amilo-1,6-glicosidase)	(Assiri <i>et al.</i> , 2018)
Glicogenose tipo IV (doença de Andersen)	1: 1.000.000	<i>GBE1</i>	Enzima ramificante do glicogénio [Amilo (1,4)→(1,6) transglicosidase]	(Kilimann e Oldfors, 2015; Orphanet Report Series, 2022)
Glicogenose tipo V (doença de McArdle)	1: 170.000 a 1: 350.000	<i>PYGM</i>	Fosforilase muscular	(De Castro <i>et al.</i> , 2015)
Glicogenose tipo IX	1: 100.000	<i>PHKA1</i> , <i>PHKA2</i> , <i>PHKB</i> ou <i>PHKG2</i>	Fosforilase cinase	(Kilimann e Oldfors, 2015; Orphanet Report Series, 2022)

\* A doença de Pompe também pode ser considerada uma doença lisossomal.

#### 2.2.2.4 Doenças mitocondriais

As doenças mitocondriais (DM) são um grupo altamente diversificado de DHM. Por terem tido especial foco na realização deste trabalho, as DM vão ser descritas à parte, no subcapítulo 2.3.

### 2.2.3 Doenças das moléculas complexas

O último grupo das DHM diz respeito a processos que ocorrem em organelos, como o aparelho de Golgi, o retículo endoplasmático, os lisossomas e os peroxissomas (Saudubray e Garcia-Cazorla, 2018). Aqui, a patogénese principal é causada por defeitos em enzimas ou transportadores celulares envolvidos na síntese, no processamento e na degradação de moléculas complexas (Ezgu, 2016).

Neste grupo, incluem-se patologias como os defeitos congénitos da glicosilação, as doenças lisossomais e peroxissomais, os defeitos da biossíntese de esteroides, defeitos no metabolismo de lípidos e lipoproteínas e ainda os defeitos congénitos da autofagia (Saudubray e Garcia-Cazorla, 2018).

#### 2.2.3.1 Defeitos congénitos da glicosilação

Muitas proteínas e lípidos sofrem um processo de glicosilação com monossacarídeos e/ou oligossacarídeos (glicanos) em diferentes compartimentos celulares, sendo que a

maioria ocorre no retículo endoplasmático ou no aparelho de Golgi (Gardeitchik *et al.*, 2018). Os defeitos congénitos da glicosilação (CDG, *Congenital disorders of glycosylation*) resultam da deficiência hereditária das enzimas necessárias para a glicosilação pós-traducional destas moléculas (Ezgu, 2016).

Atualmente, já foram descritas mais de 130 CDG, sendo estas patologias multissistémicas e muito heterogéneas, geralmente originando dismorfias e envolvendo o sistema nervoso central. Os CDG são divididos em 3 grupos: i) Defeitos da glicosilação de proteínas (N- e O-glicosilação); ii) Defeitos da glicosilação de lípidos e na âncora de glicosilfosfatidilinositol; e iii) Defeitos em múltiplas vias de glicosilação (Ondruskova *et al.*, 2021).

Coletivamente, os CDG têm uma prevalência de 1:10.000. O CDG-Ia, recentemente renomeado para PMM2-CDG, corresponde à maioria dos casos diagnosticados (cerca de 62%), apresentando uma prevalência entre 1:20.000 a 1:77.000 (Chang *et al.*, 2018; Péanne *et al.*, 2018).

Na tabela 8, estão referidos alguns CDG mais conhecidos, distribuídos pelos diferentes grupos.

**Tabela 8** | Defeitos congénitos da glicosilação.

	<b>Defeito congénito da glicosilação</b>	<b>Gene(s)</b>	<b>Proteína em défice</b>	<b>Referência</b>
N-glicosilação	PMM2-CDG (CDG-Ia)	<i>PMM2</i>	Fosfomanomutase 2	(Monin <i>et al.</i> , 2014)
	MPI-CDG (CDG-Ib)	<i>MPI</i>	Fosfomanose isomerase	(Ghaffar <i>et al.</i> , 2020)
	ALG6-CDG (CDG-Ic)	<i>ALG6</i>	$\alpha$ -1,3-glicosiltransferase	(Morava <i>et al.</i> , 2016)
O-glicosilação	EXT1/EXT2-CDG	<i>EXT1</i> ou <i>EXT2</i>	Exostosina glicosiltransferase	(Delgado <i>et al.</i> , 2014)
	POMT1/POMT2-CDG	<i>POMT1</i> ou <i>POMT2</i>	O-manosiltransferase	(Jaeken, 2013)
	GALNT3-CDG	<i>GALNT3</i>	N-Acetilgalactosaminil transferase 3	(van Tol <i>et al.</i> , 2019)
N- e O-glicosilação	ATP6V0A2-CDG	<i>ATP6V0A2</i>	<i>V0-type A2-subunit H+ transporting ATPase</i>	(Morlino <i>et al.</i> , 2021)
	COG7-CDG	<i>COG7</i>	<i>Conserved oligomeric Golgi complex subunit 7</i>	(Jaeken, 2013)



Defeito congénito da glicosilação		Gene(s)	Proteína em défice	Referência
Glicosilação de lípidos	B4GALNT1-CDG	<i>B4GALNT1</i>	$\beta$ -1,4-N-acetilgalactosaminil transferase 1	(Li e Schnaar, 2018)
	ST3GAL5-CDG	<i>ST3GAL5</i>	Lactosilceramida $\alpha$ -2,3-sialiltransferase	
Âncora GPI	PIGA-CDG	<i>PIGA</i>	Fosfatidilinositol glicano classe A	(Brodsky, 2014)

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

### 2.2.3.2 Doenças lisossomais de sobrecarga

Os lisossomas são organelos celulares que contêm enzimas que contribuem para a digestão de macromoléculas e compartimentos celulares envelhecidos (Parenti *et al.*, 2021). Dos cerca de 1.300 genes envolvidos em funções lisossomais, já foram descritas cerca de 70 doenças neurodegenerativas relacionadas com defeitos envolvendo uma enzima específica ou então um componente integral do lisossoma (Platt *et al.*, 2018). Estes defeitos impedem a completa degradação e reciclagem de macromoléculas como ácidos nucleicos, lípidos, carboidratos e proteínas, levando à sua acumulação em vesículas endossomais e lisossomais (Bellettato *et al.*, 2018).

Dependendo do tipo de macromoléculas acumuladas, as doenças lisossomais de sobrecarga podem ser divididas em 4 grupos principais: i) Esfingolipidoses, onde há a acumulação de esfingolípido; ii) Mucopolissacaridoses e Mucolipidoses, que originam a acumulação de glicosaminoglicanos; iii) Glicoproteinoses ou Oligossacaridoses, onde são acumuladas glicoproteínas; e iv) Ceroidlipofuscinoses neuronais, que levam à acumulação de lipofuscina (Platt *et al.*, 2018).

Um 5º grupo poderia também ser definido, na qual estariam inseridas outras doenças lisossomais de etiologia variada como, por exemplo: i) a glicogenose tipo II, uma vez que esta se deve a um défice de uma enzima lisossomal que origina a acumulação de glicogénio; ii) o défice da lipase ácida lisossomal (codificada pelo gene *LIPA*), que origina a acumulação de ésteres de colesterol, triglicérideos e outros lípidos; entre outros (C. Ferreira e Gahl, 2017).

As doenças mais comuns deste grupo estão descritas na tabela 9.

**Tabela 9** | Doenças lisossomais de sobrecarga mais comuns.

Doenças lisossomal	Prevalência europeia	Gene(s)	Proteínas em défice	Referência
Gangliosidose tipo 1	1:130.000	<i>GLB1</i>	$\beta$ -galactosidase	(Orphanet Report Series, 2022; Rha <i>et al.</i> , 2021)
Gangliosidose tipo 2 (variante O – Doença de Sandhoff)	1:20.000	<i>HEXB</i>	$\beta$ -Hexosaminidases A e B	(Cachon-Gonzalez <i>et al.</i> , 2018; Orphanet Report Series, 2022)
Gangliosidose tipo 2 (variante B – Doença de Tay-Sachs)		<i>HEXA</i>	$\beta$ -Hexosaminidase A	
Doença de Gaucher	1:100.000	<i>GBA</i>	Glicocerebrosidase	(Orphanet Report Series, 2022; Rosenbloom e Weinreb, 2013)
Doença de Krabbe	1:100.000	<i>GALC</i>	Galactocerebrosidase	(Kwon <i>et al.</i> , 2018; Orphanet Report Series, 2022)
Leucodistrofia Metacromática	1:100.000	<i>ARSA</i> ou <i>PSAP</i>	Arilsulfatase A ou Prosaposina	(Orphanet Report Series, 2022; Shaimardanova <i>et al.</i> , 2020)
Doença de Fabry	1:450.000	<i>GLA</i>	$\alpha$ -galactosidase A	(Orphanet Report Series, 2022; Ortiz <i>et al.</i> , 2018)
Doença de Niemann-Pick tipo A	1:400.000	<i>SMPD1</i>	Esfingomielinase	(Orphanet Report Series, 2022; Schuchman e Desnick, 2017)
Doença de Niemann-Pick tipo B	1:250.000			
Doença de Niemann-Pick tipo C	1:100.000	<i>NPC1</i> ou <i>NPC2</i>	Transportadores intracelular do colesterol	(Orphanet Report Series, 2022; Wheeler e Sillence, 2020)
MPS tipo 1 (Doença de Hurler-Scheie)	1:50.000	<i>IDUA</i>	$\alpha$ -L-iduronidase	(Orphanet Report Series, 2022; Suarez-Guerrero <i>et al.</i> , 2016)
MPS tipo 2 (Doença de Hunter)	1:500.000	<i>IDS</i>	Iduronato-2-sulfatase	
MPS tipo 3A (Doença de Sanfilippo A)	1:330.000	<i>SGSH</i>	Heparano-N-sulfatase	
MPS tipo 3B (Doença de Sanfilippo B)		<i>NAGLU</i>	$\alpha$ -N-acetil glicosaminidase	
MPS tipo 3D (Doença de Sanfilippo C)		<i>HGSNAT</i>	Acetil-CoA $\alpha$ -glicosamina acetiltransferase	
MPS tipo 3D (Doença de Sanfilippo C)		<i>GNS</i>	N-acetilglicosamina-6-sulfatase	
MPS tipo 4 (Doença de Morquio)	1:6.500	<i>GALNS</i> ou <i>GLB1</i>	Galactose-6-sulfatase ou $\beta$ -galactosidase	
MPS tipo 6 (Doença de Maroteaux-Lamy)	1:625.000	<i>ARSB</i>	Arilsulfatase B	

MPS: Mucopolissacaridose.

Doença lisossomal	Prevalência europeia	Genética	Proteínas em défice	Referência	
Ceroidlipofuscinose neuronal	1:50.000	13 genes diferentes	13 proteínas diferentes (maioritariamente enzimas e transportadores transmembranares)	(Orphanet Report Series, 2022; Platt <i>et al.</i> , 2018)	
Mucopolídeos	Mucopolídose tipo II	1:100.000	<i>GNPTAB</i>	N-acetilglucosaminil-1-fosfotransferase (subunidades $\alpha$ e $\beta$ )	(Khan e Tomatsu, 2020; Orphanet Report Series, 2022)
	Mucopolídose tipo III	1:300.000	<i>GNPTG</i>	N-acetilglucosaminil-1-fosfotransferase (subunidade $\gamma$ )	
Oligossacarídeos	$\alpha$ -Manosidose	1:715.000	<i>MAN2B1</i>	$\alpha$ -manosidase	(Orphanet Report Series, 2022; Paciotti <i>et al.</i> , 2017)
	$\beta$ -Manosidose	1:1.000.000	<i>MANBA</i>	$\beta$ -manosidase	(Gytz <i>et al.</i> , 2019; Orphanet Report Series, 2022)

### 2.2.3.3 Doenças peroxissomais

Os peroxissomas são organelos membranares presentes no citoplasma das células e estão envolvidos na síntese de plasmalogénios / éter-fosfolípidos assim como na síntese de ácidos biliares. Têm também uma importante função na  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos de cadeia muito longa e na eliminação de compostos tóxicos para a célula (Aubourg e Wanders, 2013; Bellettato *et al.*, 2018).

As doenças peroxissomais são patologias neurodegenerativas que podem ser classificadas em dois grupos: i) Defeitos na biogénese dos peroxissomas (nomeadamente síndromes do espectro de Zellweger e condrodysplasia rizomérica puntacta do tipo I); e ii) Défices enzimáticos isolados que comprometem a alfa, beta ou ómega oxidação peroxissomal (C. Ferreira e van Karnebeek, 2019).

Na tabela 10, estão descritas as doenças mais comuns dos peroxissomas.

**Tabela 10** | Doenças peroxissomais mais comuns.

Doença peroxissomal	Prevalência	Gene(s)	Proteína em défice	Referência
Adrenoleucodistrofia ligada ao X	1: 17.000	<i>ABCD1</i>	<i>ATP-binding cassette</i> subfamília D1	(Engelen <i>et al.</i> , 2012)
Síndromes do espectro de Zellweger	1: 50.000 a 1: 100.000	13 genes <i>PEX</i> (60% em <i>PEX1</i> )	Pexinas	(Klouwer <i>et al.</i> , 2015)
Condrodisplasia rizomérica puntacta do tipo I	1: 100.000	<i>PEX7</i>	Pexina 7	(González-Ortiz <i>et al.</i> , 2017)
Défice da proteína D-bifuncional peroxissomal	1: 100.000	<i>HSD17B4</i>	Proteína D-bifuncional	(Ferdinandusse <i>et al.</i> , 2006)

## 2.3 Doenças mitocondriais

As DM são um grupo de doenças genéticas que levam ao comprometimento de determinada função mitocondrial, afetando assim maioritariamente órgãos e tecidos com alta dependência energética (Alston *et al.*, 2017). Estudos recentes determinam que a prevalência destas doenças é cerca de 1:5.000 nados vivos e os sintomas clínicos destas doenças podem surgir tanto na infância como na idade adulta (Y. Ng e Turnbull, 2016).

As DM envolvem vários órgãos, podendo, no entanto, ocorrer também em órgãos isolados. Por necessitarem de um grande aporte energético, os tecidos mais afetados são os neurónios, o músculo esquelético e o músculo cardíaco (Chan, 2020). Sintomas comuns englobam epilepsia, ataxia, hipotonia, sinais de doenças neurodegenerativas, comprometimento do desenvolvimento motor e cognitivo, surdez e problemas visuais, hepáticos ou cardíacos (Gorman *et al.*, 2016).

As funções mitocondriais são reguladas pelo duplo envolvimento do genoma mitocondrial (mtDNA) e do genoma nuclear (nDNA). Consequentemente, as DM são um grupo de DHM que possuem uma expressão clínica e genética muito heterogénea (Moggio *et al.*, 2014), sendo transmitidas por vários padrões de transmissão, desde transmissão por via materna – mtDNA – até transmissão com padrão mendeliano – nDNA (Gorman *et al.*, 2016).

### 2.3.1. Mitocôndria

A principal função das mitocôndrias é a produção celular de energia (ATP) via cadeia respiratória mitocondrial (CRM) e fosforilação oxidativa (OXPHOS), estando também envolvidas em processos como a homeostasia do cálcio, no ciclo do TCA, na biossíntese do grupo heme e de algumas hormonas esteroides, na  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos e também no controlo da mitofagia e da apoptose (Craven *et al.*, 2017).

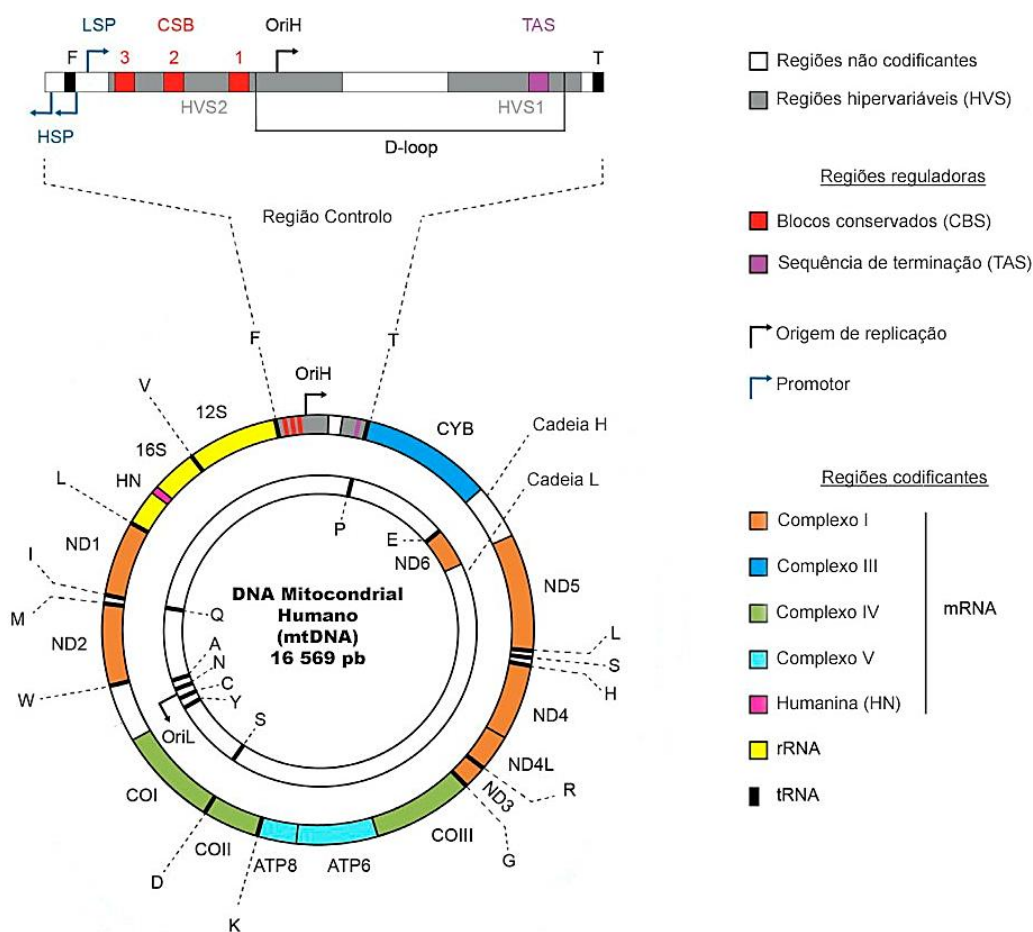
Segundo a teoria endossimbiótica, as mitocôndrias ancestrais eram células procarióticas que foram endocitadas por uma das primeiras células ancestrais do tipo eucariota (Roger *et al.*, 2017). Uma vez integradas, o genoma destas mitocôndrias sofreu um processo co-evolução e de perda progressiva de genes: a maioria dos genes essenciais foram transferidos para o nDNA, outros perderam-se e só uma pequena fração destes foi mantida no mtDNA. É por esta razão que as funções mitocondriais são reguladas pelo duplo envolvimento do mtDNA e do nDNA (Brandvain e Wade, 2009).

### 2.3.2 Genoma mitocondrial vs. Genoma nuclear

O mtDNA é composto por uma pequena molécula circular de DNA de cadeia dupla com apenas 16.569 pares de bases (Dard *et al.*, 2020). Como consequência da adaptação do mtDNA à célula eucariótica, este genoma apresenta uma grande economia de organização: este é compacto e sem intrões, possuindo pouco DNA intergénico e algumas sequências parcialmente sobrepostas (Amorim *et al.*, 2019).

A molécula de mtDNA é composta por duas cadeias: a cadeia pesada (H – *Heavy strand*), que é rica em guaninas, e a cadeia leve (L – *Ligh strand*), que é rica em citosinas. É na cadeia pesada que é codificada a maioria da informação genética (Falkenberg, 2018).

O mtDNA, esquematizado na figura 1, é composto por uma região codificante e por uma região não codificante / controlo. No Homem, a região codificante codifica 37 genes: 13 polipéptidos essenciais à fosforilação oxidativa, 22 RNAs de transferência necessários à tradução dos 13 mRNAs mitocondriais e 2 RNA ribossomais (Yan *et al.*, 2019).



**Figura 1** | Representação esquemática do genoma mitocondrial humano. Adaptado de (Fontana e Gahlon, 2020)

O complexo multienzimático da OXPHOS é constituído por 5 complexos enzimáticos diferentes. Destes, 4 são codificadas pelo mtDNA: 7 subunidades do Complexo I (genes MT-ND1, MT-ND2, MT-ND3, MT-ND4L, MT-ND4, MT-ND5 e MT-ND6); a subunidade do Complexo III (MT-CYB); 3 subunidades do Complexo IV (genes MT-COI, MT-COII e MT-COIII) assim como as 2 subunidades do Complexo V (genes MT-ATP6 e MT-ATP8) (Young e Copeland, 2016).

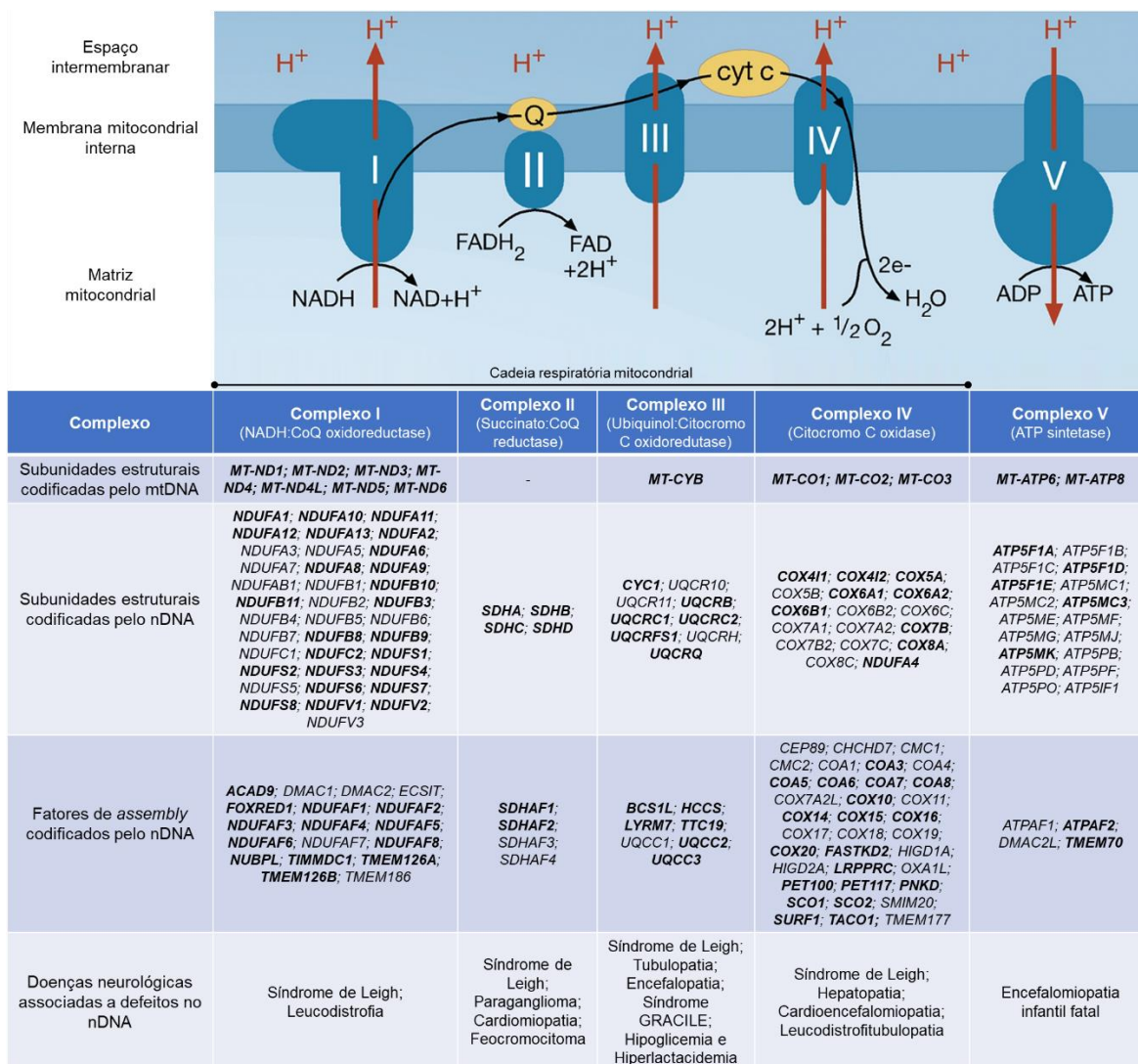
Por outro lado, a região controlo é uma região não codificante composta pela *Displacement-loop (D-loop)* e por 2 promotores que intervêm na transcrição dos genes mitocondriais (promotor da cadeia H – HSP, e o promotor da cadeia L – LSP). Esta região também abriga a origem da replicação da cadeia H (OriH). A origem da replicação da cadeia L (OriL) encontra-se fora da região controlo, a 11.000 pares de base a jusante de OriH e perto de um *cluster* de 5 tRNAs (Falkenberg, 2018).

No entanto, a grande maioria das mais de 1.500 proteínas do proteoma mitocondrial são codificadas pelo nDNA, sendo sintetizadas no citosol das células e posteriormente transportadas para o interior da mitocôndria (Chan, 2020). Dos 99 genes das subunidades estruturais da OXPHOS, apenas 13 são codificados pelo mtDNA, sendo os restantes 86 codificados pelo nDNA (figura 2). O complexo I é o maior complexo da CRM, contando com 44 subunidades, das quais 37 são codificados pelo nDNA. O complexo II é o mais pequeno da CRM e as suas 4 subunidades estruturais são codificadas exclusivamente pelo nDNA. O complexo III é composto por 11 subunidades, 10 das quais são codificadas pelo nDNA, enquanto o complexo IV contém 20 subunidades, das quais 17 são codificados pelo nDNA. Por último, o complexo V é composto por 20 subunidades sendo 18 destas codificados pelo nDNA (Alston *et al.*, 2017; Cerqua *et al.*, 2021).

Adicionalmente, a biogênese do sistema OXPHOS conta também com cerca de 68 genes nucleares que codificam fatores essenciais ao *assembly* dos diferentes complexos: 18 genes para o *assembly* do complexo I, 4 para o complexo II, 7 para o complexo III, 35 para o complexo IV e 4 para o complexo V (Cerqua *et al.*, 2021).

### 2.3.3 Doenças mitocondriais causadas por alterações no genoma mitocondrial

As DM podem ser causadas por mutações pontuais e/ou rearranjos ao nível do mtDNA (Dard *et al.*, 2020). Todas as variantes encontradas no mtDNA estão inseridas na base de dados MITOMAP ([www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)) (Alston *et al.*, 2017).



**Figura 2 |** Complexo da OXPHOS: subunidades estruturais e fatores de *assembly* associados.

Os complexos multiméricos I-IV transportam elétrons ao longo da cadeia respiratória, facilitados pela redução dos cofatores coenzima Q10 / Ubiquinona (Q) e Citocromo c (Cyt c). A transferência de elétrons está também associada à transferência de prótons (H+) através da membrana mitocondrial interna, que são usados pelo complexo V para sintetizar ATP a partir de ADP. Os genes que estão associados a doença estão identificados a negrito. Adaptado de (Alston *et al.*, 2017).

### 2.3.3.1 Heteroplasmia e Efeitos *Threshold* e *Bottleneck*

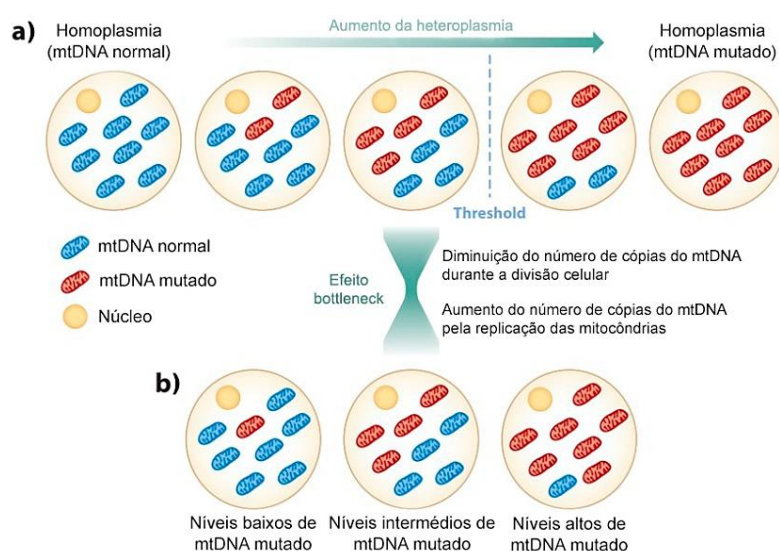
Pelo facto de poderem existir várias cópias de mtDNA na mesma mitocôndria ou na mesma célula e também pelo facto do mtDNA ter uma taxa de mutação muito maior que o nDNA, torna-se possível a coexistência, no mesmo indivíduo, de diferentes moléculas de mtDNA (Gorman *et al.*, 2015). A coexistência de mtDNA normal e mtDNA mutado no mesmo indivíduo dá-se o nome de heteroplasmia. Por outro lado, se as moléculas de mtDNA possuírem o mesmo genótipo (quer normal, quer mutado), estamos perante um fenómeno de homoplasmia (Nissanka e Moraes, 2020).

A taxa de heteroplasmia varia de tecido para tecido e conforme a idade do indivíduo. Além disso, o aconselhamento genético é muitas vezes difícil, visto que a transmissão da

heteroplasmia é aleatória devido ao efeito de *bottleneck*: células germinativas contendo diferentes cópias de mtDNA, após replicação, distribuem aleatoriamente as mitocôndrias pelo citoplasma das células mãe e filha (Craven *et al.*, 2017).

Por outro lado, a razão entre o mtDNA normal e o mtDNA mutado vai-se definir quando um fenótipo de determinada doença mitocondrial começa a ser expresso: limiar de expressão do fenótipo ou efeito *threshold* (Filograna *et al.*, 2021). Assim, percentagens elevadas de heteroplasmia (> 80%) estão associados a fenótipos graves da doença, enquanto percentagens intermédias de heteroplasmia (30 a 80%) estão associados a fenótipos moderados. Por sua vez, baixas percentagens de heteroplasmia (< 30%) podem não apresentar qualquer sintoma (Nissanka e Moraes, 2020).

A figura 3 representa graficamente estes processos descritos.



**Figura 3** | Representação das situações de homoplasmia, heteroplasmia e dos efeitos de *threshold* e *bottleneck*. Em **a)** é possível observar-se situações de níveis crescentes de heteroplasmia. As células toleram normalmente níveis moderados de heteroplasmia, sendo necessário níveis de heteroplasmia que ultrapassam um determinado *threshold* para que o fenótipo de determinada doença mitocondrial comece a ser expresso. Em **b)** é possível observar-se o efeito de *bottleneck*, onde a partir de uma célula-mãe com nível moderado de heteroplasmia, após replicação, se obtém células-filhas com diferentes níveis de heteroplasmia. Adaptado de (Craven *et al.*, 2017)

### 2.3.3.2 Mutações pontuais

Sabe-se que o mtDNA possui uma taxa de mutação muito superior à do nDNA. Uma das razões que explica isto é o facto de a polimerase mitocondrial possuir uma baixa fidelidade e de não ter atividade *proofreading*, além de que a ausência de histonas e os níveis elevados de radicais livres de oxigénio produzidos proporcionam grandes danos oxidativos no mtDNA (Amorim *et al.*, 2019). Apesar disso, o mtDNA consegue ser reparado através de proteínas específicas codificadas pelo nDNA e que são posteriormente transportadas para a mitocôndria (Saki e Prakash, 2017).



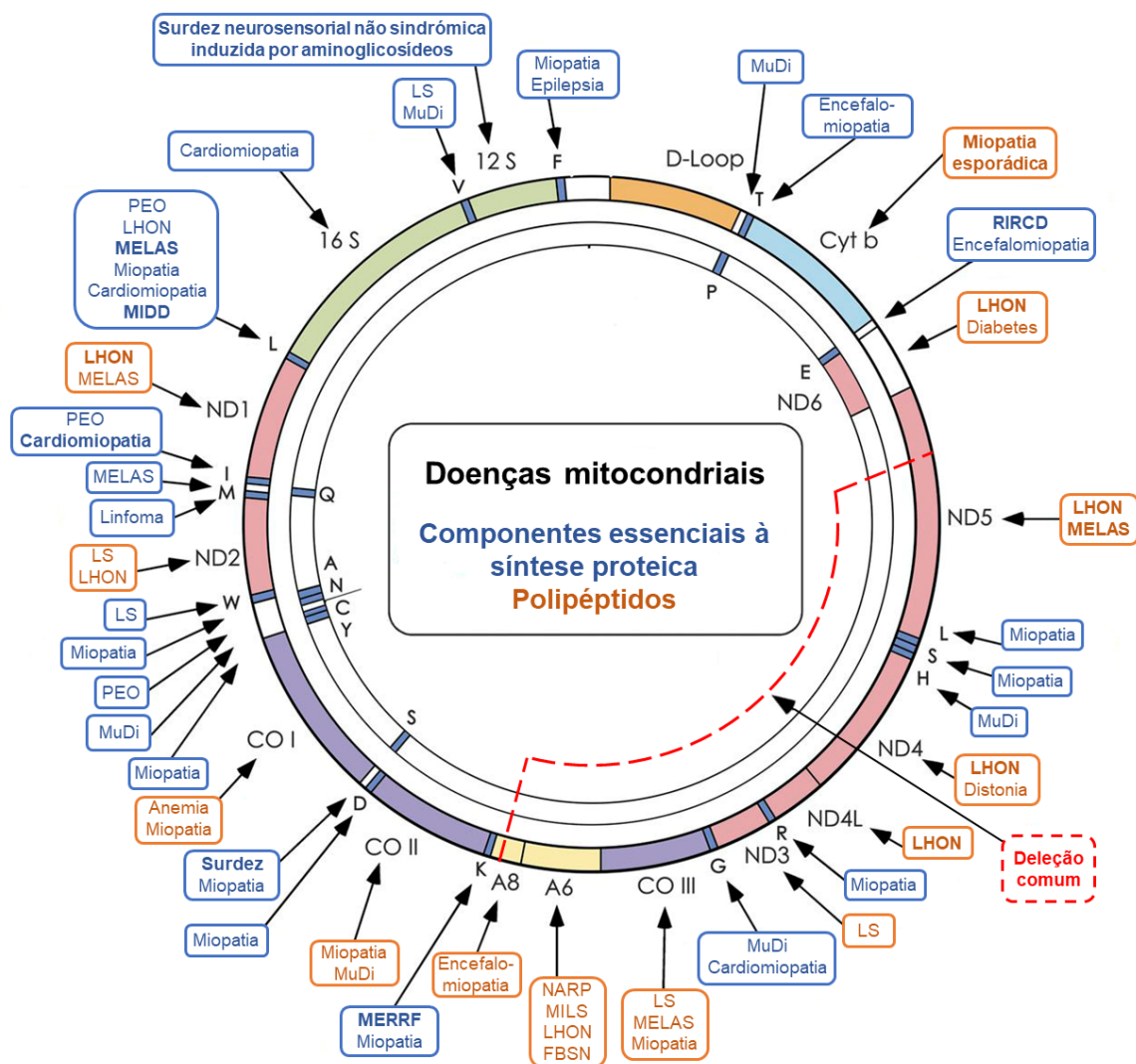
As mutações pontuais são transmitidas por via materna ou então devem-se a mutações *de novo*. Já estão descritas mais de 500 mutações no mtDNA e este número tem vindo a aumentar, registando-se 5 a 10 novas mutações por ano (Nissanka e Moraes, 2020). Entre as DM do mtDNA, há 5 síndromes mais comuns. A primeira doença a ser reportada foi a Neuropatia ótica hereditária de Leber (LHON, *Leber hereditary optic neuropathy*), sendo esta a mais prevalente, seguindo-se depois a Encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios similares a acidentes vasculares cerebrais (MELAS, *Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes*). A terceira síndrome pode-se expressar de duas formas: (1) Neuropatia com ataxia e retinite pigmentosa (NARP, *Neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa*), que afeta normalmente jovens adultos e (2) Síndrome de Leigh de transmissão materna (MILS, *Maternally inherited Leigh syndrome*), que possui um quadro de encefalopatia mais severo e ocorre ainda na infância. Por último, encontra-se a síndrome Epilepsia mioclónica e fibras vermelhas rotas (MERRF, *Myoclonic epilepsy with ragged-red fibers*) (DiMauro *et al.*, 2017; Gorman *et al.*, 2016; Molnar e Kovacs, 2017; Nissanka e Moraes, 2020).

Na figura 4, podemos encontrar o mapa de morbilidade da maioria das doenças causadas por mutações pontuais do mtDNA.

### 2.3.3.3 Rearranjos do mtDNA

Os rearranjos do mtDNA são alterações esporádicas, não sendo por norma condições herdadas. A maioria dos rearranjos diz respeito a grandes deleções únicas do mtDNA, apesar de existirem também casos de duplicações (T. Chen *et al.*, 2011). Estes rearranjos ocorrem sempre em heteroplasmia e as deleções variam entre 1.3 a 8 *kilobases*, resultando na perda de vários polipéptidos assim como tRNAs e rRNAs (Tuppen *et al.*, 2010).

As deleções únicas em larga escala podem ocorrer em qualquer lugar do mtDNA. No entanto, existe uma deleção que é a mais prevalente, sendo designada por deleção comum. Esta deleção causa a perda de 4.977 pares de bases do mtDNA e resulta na perda de 12 genes essenciais, nomeadamente 7 polipéptidos da OXPHOS (ATP8, ATP6, COIII, ND3, ND4L, ND4, and ND5) e 5 tRNAs (G, R, H, S e L). Esta deleção é provocada pelo mecanismo de *slipped strand mispairing*, uma vez que existem sequências repetitivas de 13 pares de bases nos pontos de quebra (Phillips *et al.*, 2017).



**Figura 4 |** Mapa de morbidade das mutações do genoma mitocondrial humano.

A laranja, estão representadas as doenças causadas por mutações em genes codificadores de polipéptidos. A azul, estão representadas as doenças causadas por mutações em genes responsáveis por codificar componentes essenciais à síntese proteica. As doenças que são mais frequentemente associadas a determinado gene estão destacadas a negrito. FBSN: Necrose do estriado bilateral familiar; LHON: Neuropatia ótica hereditária de Leber; LS: Síndrome de Leigh; MELAS: Encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios similares a acidentes vasculares cerebrais; MERRF: Epilepsia mioclónica e fibras vermelhas rotas; MIDD: Diabetes e surdez de hereditariedade materna; MILS: Síndrome de Leigh de herança materna; MuDi: Desordens multissistémicas; NARP: Neuropatia com ataxia e retinite pigmentosa; PEO: Oftalmoplegia externa progressiva; RIRCD: Défice infantil reversível da cadeia respiratória. Adaptado de (DiMauro *et al.*, 2017).

As três síndromes mais comuns associadas a deleções no mtDNA são a síndrome de Kearns–Sayre, a síndrome de Pearson e a Oftalmoplegia externa progressiva crónica (CPEO, *Chronic Progressive External Ophthalmoplegia*) (Fontana e Gahlon, 2020).

### 2.3.4 Doenças mitocondriais causadas por alterações no genoma nuclear

Tal como referido anteriormente, a maioria dos genes essenciais às funções mitocondriais foram transferidos para o nDNA como consequência do processo de adaptação da mitocôndria à integração na célula eucariótica (Brandvain e Wade, 2009). Atualmente, já foram descritas mais de 1.500 proteínas que são expressas na mitocôndria. A maioria destas mitoproteínas está envolvida na OXPHOS e as restantes em processos como a biogénese das mitocôndrias, a biossíntese dos fosfolípidos membranares e seus transportadores mitocondriais e ainda na comunicação intergenómica (Stenton e Prokisch, 2020).

Funcionalmente, as alterações no nDNA que causam DM podem ser divididas em 5 grupos distintos: i) Defeitos em genes de subunidades estruturais e de *assembly* que codificam proteínas da cadeia respiratória; ii) Defeitos em genes essenciais à tradução das proteínas mitocondriais; iii) Defeitos na dinâmica mitocondrial (fusão, fissão, estabilidade e morfologia das mitocôndrias); iv) Defeitos nos fosfolípidos e transportadores da membrana mitocondrial interna; e v) Defeitos na comunicação intergenómica (Molnar e Kovacs, 2017).

Na tabela 11, estão descritos os genes dos 5 grupos de DM associadas a alterações no nDNA.

**Tabela 11** | Doenças mitocondriais associadas a variantes no genoma nuclear.

Grupo	Descrição	Doenças associadas
Defeitos em genes que codificam proteínas da cadeia respiratória mitocondrial	Defeitos em genes que codificam subunidades estruturais e fatores de <i>assembly</i> dos complexos da OXPHOS (por exemplo, genes da família <i>NDUF</i> , <i>SDH</i> , <i>UQCR</i> , <i>COX</i> ), assim como genes envolvidos na biossíntese da Coenzima Q10 (por exemplo, família de genes <i>COQ</i> ).	Alterações na maioria destes genes estão frequentemente associados à Síndrome de Leigh. Outras patologias incluem défices isolados dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial, encefalopatias ou ainda leucodistrofias.
Defeitos em genes essenciais à tradução dos péptidos mitocondriais	Defeitos em genes envolvidos na síntese dos tRNAs ( <i>DARS2</i> , <i>EARS2</i> , <i>YARS2</i> , ...), no processamento dos tRNAs (por exemplo, <i>PUS1</i> e <i>TRMU</i> ), fatores de transcrição (por exemplo, <i>TUFM</i> e <i>TSFM</i> ) e ainda na síntese dos ribossomas (família de genes <i>MRPS</i> e <i>MRPL</i> ) mitocondriais.	Leucoencefalopatias, miopatias e défices combinados da fosforilação oxidativa.

Grupo	Descrição	Doenças associadas
Defeitos na dinâmica mitocondrial	Neste grupo, estão inseridos os genes envolvidos na fusão (por exemplo, <i>MFN1</i> e <i>MFN2</i> ), na fissão (por exemplo, <i>DNM1L</i> ), na estabilidade ( <i>OPA1</i> ) e na morfologia (por exemplo, <i>YME1L1</i> ) mitocondrial.	Alterações na fusão mitocondrial provocam a doença <i>Charcot-Marie-Tooth</i> do tipo 2A. Alterações nos restantes genes provocam atrofia ótica.
Defeitos nos fosfolípidos e transportadores da membrana mitocondrial interna	Neste grupo inserem-se defeitos em genes como <i>TAZ</i> , que catalisa a maturação da cardiolipina ou os genes <i>AGK</i> e <i>SERAC1</i> , que codificam proteínas envolvidas no metabolismo fosfolipídico. Genes como <i>TIMM8A</i> , <i>TIMM22</i> ou <i>TIMM50</i> associam-se que defeitos nos transportadores da membrana mitocondrial interna.	Várias síndromes como: a síndrome de Barth ( <i>TAZ</i> ), a síndrome de Sengers ( <i>AGK</i> ), a síndrome de MEGDEL ( <i>SERAC1</i> ) ou a síndrome de Mohr–Tranebjaerg ( <i>TIMM8A</i> ).
Defeitos na comunicação intergenómica	Devem-se a variantes patogénicas em genes envolvidos na replicação do mtDNA (por exemplo, <i>POLG</i> ou <i>TWINK</i> ) ou em genes que codificam mitoproteínas envolvidas no metabolismo dos desoxirribonucleótidos presentes na mitocôndria (por exemplo, <i>DGUOK</i> , <i>TYMP</i> ou <i>TK2</i> ).	Deleções múltiplas e depleção do mtDNA.

MEGDEL: Acidúria 3-metil-glutacónica tipo IV. Adaptado de Molnar e Kovacs, 2017 e Stenton e Prokisch, 2020

# **Capítulo 3**

---

## **Objetivos**



O objetivo principal do presente estudo foi esclarecer a etiologia molecular de indivíduos com doenças genéticas raras, pela análise do seu exoma clínico através de abordagens de sequenciação de nova geração.

Neste âmbito, este estudo teve como objetivos específicos:

- a) Realizar uma revisão bibliográfica sobre as doenças hereditárias do metabolismo;
- b) Executar trabalho prático na área de Sequenciação de Nova Geração;
- c) Análise bioinformática e respetiva interpretação das variantes genéticas identificadas;
- d) Estudo do RNA para pesquisar o segundo alelo causal em genes candidatos.





## **Capítulo 4**

---

### **Doentes e Métodos**



## 4.1 Doentes

Ao longo deste trabalho, foram investigados 23 doentes cuja informação clínica está detalhada na tabela 12.

**Tabela 12** | Caracterização dos doentes.

Doente	Sexo	Idade	Informação clínica
D1a	M	5 anos	Irmãos com acidúria metilmalónica isolada.
D1b	M	12 anos	
D2	M	1 ano	Défice neonatal de vitamina B12 e acidúria metilmalónica.
D3	F	26 anos	Acidúria metilmalónica isolada e perfil dos ácidos orgânicos sugestivo de <i>MUT-</i> .
D4	M	3 anos	Hiposerinemia, epilepsia, espasmos e distúrbio do movimento.
D5	M	50 anos	Fraqueza muscular, intolerância ao esforço com elevação do lactato e acilcarnitinas com perfil de <i>MADD-like</i> .
D6	F	21 anos	Síndrome de Leigh, hiperlactacidemia, alterações dos ácidos orgânicos e atividade enzimática da cadeia respiratória mitocondrial normal.
D7 †	M	1 mês	Disfunção multiorgânica desde o nascimento, cardiomegalia, disfunção ventricular, hipertensão pulmonar grave, disfunção hepática com elevação das transaminases, disfunção neurológica com convulsões, hemorragia do cerebelo, hiperlactacidemia, anemia e trombocitopenia.
D8	M	8 anos	Encefalite necrotizante, hiperaminoacidúria e prova de sobrecarga com glicose com elevação de lactato e piruvato.
D9	M	58 anos	Ataxia cerebelosa, paraparesia espástica progressiva, neuropatia e surdez neurossensorial.
D10	F	23 anos	Atraso de crescimento desde criança, cardiomiopatia, epilepsia, cegueira cortical, miopatia, fraqueza dos membros inferiores, RMN cerebral com lesão medular, atrofia medular superior e ganglioblastoma. História familiar materna de surdez.
D11 †	F	42 anos	Síndrome distónico de início na infância, diabetes, demência e morte súbita. História familiar materna de epilepsia.
D12	F	3 anos	Suspeita de síndrome de Leigh.
D13 †	F	1 mês	Nascimento pré-termo com restrição do desenvolvimento fetal, hipotonia, cardiomiopatia hipertrófica, acidose metabólica e hiperlactacidemia. Faleceu aos 40 dias.
D14	M	59 anos	Retinopatia pigmentar, miopatia com <i>red ragged fibers</i> , neuropatia sensitiva axonal grave, acidentes vasculares cerebrais de repetição em jovem, surdez neurossensorial, deleções múltiplas no mtDNA. RMN cerebral com várias lesões e pico de lactato.

D15	F	67 anos	Paraparésia espástica, ataxia cerebelosa, oftalmoplegia externa crónica progressiva e deleções múltiplas do mtDNA. Natural de Cabo Verde.
D16	F	54 anos	Ptose, oftalmoparésia crónica progressiva e deleções múltiplas do DNA mitocondrial.
D17	M	8 anos	Apneia central grave e suspeita de síndrome de Leigh.
D18	M	11 anos	Ataxia congénita, epilepsia mioclónica e estrabismo. Suspeita de síndrome de Leigh.
D19	F	12 anos	Depleção do mtDNA, disfagia e fraqueza dos músculos faciais, refluxo vesico-ureteral bilateral e atraso do desenvolvimento motor.
D20 †	F	<1 mês	Nascimento pré-termo, hiperlactacidemia, hiperaminoacidúria grave generalizada, diabetes neonatal, onfalocele, cardiopatia congénita e alterações dos ácidos orgânicos.
D21	F	4 anos	Hipotonia grave, atraso do desenvolvimento psicomotor, tetralogia de Fallot, tremor e RMN cerebral com lesões simétricas nos gânglios basais. Irmã possui um quadro clínico semelhante.
D22	M	3 anos	Hiperlactacidemia e hiperalaninemia, hipotonia, ataxia e alterações dos ácidos orgânicos.

M: Masculino; F: Feminino; RMN: Ressonância magnética.

Este estudo foi aprovado pelo Comité de Ética do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, tendo sido também obtidos os consentimentos informados para estudos genéticos de todos os doentes investigados.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Extração e quantificação do DNA e RNA

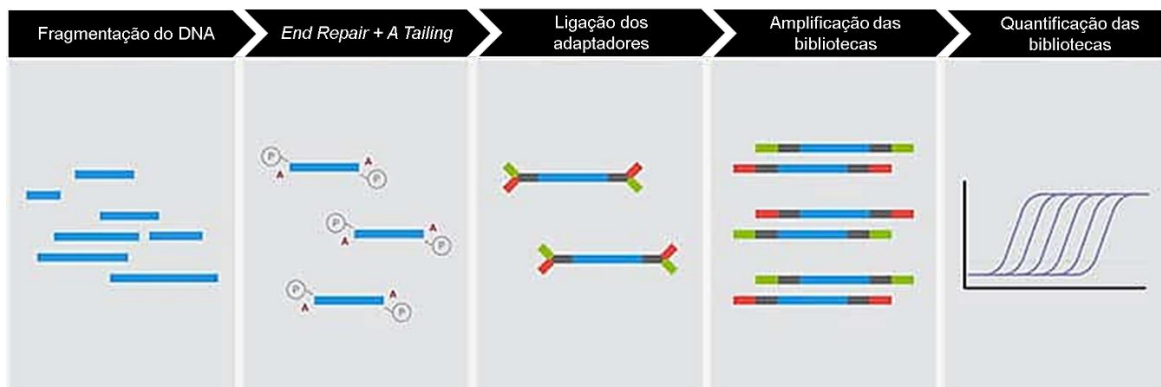
O DNA foi extraído a partir de leucócitos do sangue total, através do kit comercial *EZ1 DNA Blood 350 µl* (QIAGEN®). A extração de RNA foi realizada a partir de sangue total, pelo kit comercial *PAXgene Blood RNA* (QIAGEN®).

A quantificação dos ácidos nucleicos foi efetuada por *NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer*.

### 4.2.2 Sequenciação de Nova Geração

#### 4.2.2.1 Captura dos genes e NGS

Os genes de interesse de cada doente foram capturados usando o protocolo *SureSelect QXT Target Enrichment System For Illumina Multiplexed Sequencing Platforms* (Agilent Technologies, 2021), cujas etapas essenciais estão exemplificadas na figura 5.



**Figura 5** | Representação esquemática das etapas da preparação das bibliotecas genómicas.

A sequenciação por NGS foi realizada no equipamento *Illumina Miseq™*.

#### 4.2.2.2 Variant calling e anotação das variantes

O alinhamento das *reads* e a *variant calling* foram efetuados com o auxílio da ferramenta informática *Surecall* (Agilent Technologies). A anotação das variantes foi realizada pelo programa *wANNOVAR*, disponível em <https://wannovar.wglab.org>.

### 4.2.2.3 Análise das variantes

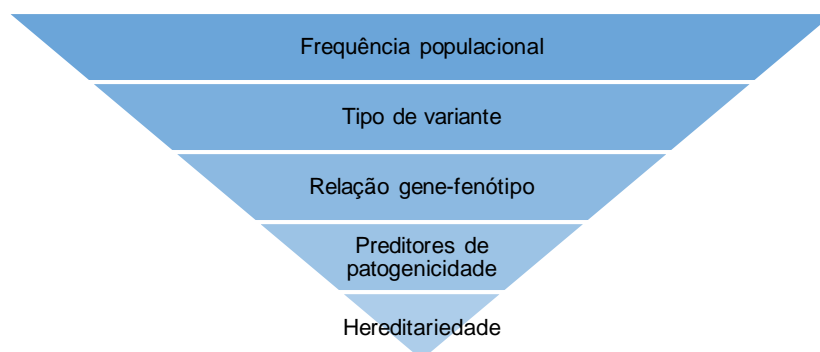
As variantes identificadas foram filtradas e analisadas tendo em conta 4 fatores:

- a) a *Minor Allele Frequency* [apenas foram contabilizados os alelos com frequência populacional menor que 1% nas bases de dados *1000 Genomes* (<https://www.internationalgenome.org>) e *Exome Aggregation Consortium* e *Genome Aggregation Database* (<https://gnomad.broadinstitute.org>)];
- b) o tipo de variante (*frameshift* > *stop-gain* > *slop-loss* > *inframe* > *missense* > variantes dos locais de *splicing* > variantes das regiões 5' ou 3' não traduzidas > sinónimas);
- c) a predição de patogenicidade (*SIFT*, *PolyPhen-2*, *MutationTaster*, *Mutation Assessor* e *CADD*) e de alteração do *splicing* natural [*Alamut Visual Plus* (*SOPHiA GENETICS*)];
- d) presença em bases de dados (*dbSNP*, *HGMD professional*, *OMIM*, *Varsome*, *ClinVar* e *gnomAD*).

As variantes não descritas em qualquer base de dados foram categorizadas conforme as *guidelines* publicadas pelo *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) (Richards *et al.*, 2015).

### 4.2.3 Pipeline bioinformática

Para a análise das variantes, foi desenvolvida a *pipeline* bioinformática que está resumida na figura 6.



**Figura 6 | Pipeline bioinformática.**

Para analisar as variantes identificadas, foi estabelecida uma *pipeline* bioinformática que permitiu uma análise por fases. Em primeiro lugar, apenas foram contabilizados os alelos com frequência populacional inferior a 1%. De seguida, analisou-se as variantes *frameshift* e *nonsense* e posteriormente as restantes variantes. Adicionalmente, foi verificado se estas variantes estavam descritas na literatura ou em plataformas como o *HGMD professional*. Em terceiro lugar, verificou-se a concordância entre genótipo e fenótipo, através da consulta de plataformas como o *OMIM* ou a *PubMed*. Por fim, foi tido em conta a predição de patogenicidade utilizando ferramentas de análise *in silico* e também o tipo de hereditariedade descrita para cada gene (por exemplo, quando se identificava apenas uma variante de interesse em genes com padrão autossómico recessivo, era verificado se existiam variantes adicionais neste gene que estivessem descritas como polimorfismos funcionais).

Relativamente aos preditores de patogenicidade, para variantes *missense* foram analisados os preditores *SIFT*, *PolyPhen-2*, *MutationTaster*, *Mutation Assessor* e *CADD*. As variantes do *splicing* foram analisadas com o auxílio da ferramenta *Alamut Visual Plus* (que incorpora os preditores *NNSPLICE*, *GeneSplicer*, *MaxEntScan* e *Human Splice Finder*). Na tabela 13, estão descritas as funcionalidades de cada preditor utilizado.

**Tabela 13** | Preditores de patogenicidade ou de alteração do *splicing* utilizados.

Preditor	Descrição e Website	Referência
<i>SIFT</i> ( <i>Sorting Intolerant from Tolerant</i> )	Prevê com base na homologia da sequência e na semelhança físico-química entre os aminoácidos alterados, se a substituição afetará a função da proteína. Os <i>scores</i> variam entre 0 e 1 e <i>scores</i> inferiores a 0.05 classificam a substituição como “Deletéria”. <i>Scores</i> superiores a 0.05 indicam que a substituição é “Tolerada”. <a href="http://sift.bii.a-star.edu.sg/">http://sift.bii.a-star.edu.sg/</a>	(P. Ng e Henikoff, 2003)
<i>PolyPhen-2</i> ( <i>Polymorphism Phenotyping v2</i> )	Prevê o possível impacto da substituição aminoacídica na estabilidade e função das proteínas através de abordagens estruturais e conservativas evolutivas. Os <i>scores</i> variam entre 0 e 1 e <i>scores</i> superiores a 0,908 são classificados como “Provavelmente patogénica”. <i>Scores</i> entre 0,446 e 0,908 são classificados como “Possivelmente patogénica” e <i>scores</i> menores que 0,446 são classificados como “Benignas”. <a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/</a>	(Adzhubei et al., 2010)
<i>MutationTaster</i>	Analisa a conservação evolutiva do aminoácido original assim como a frequência do alelo alterado, a possibilidade de perda da função proteica e alterações que podem afetar a quantidade de mRNA. As variantes são classificadas como “Polimorfismo” ou “Causadora de doença”. Os <i>scores</i> variam entre 0 e 1 e quanto mais próximo de 1, maior a probabilidade de confiança da classificação indicada. <a href="https://www.mutationtaster.org/">https://www.mutationtaster.org/</a>	(Schwarz et al., 2010)
<i>Mutation Assessor</i>	Prevê o impacto funcional das substituições de aminoácidos, analisando a conservação evolutiva do aminoácido afetado em proteínas homólogas. Os <i>scores</i> são classificados como: “Neutro” ( <i>scores</i> entre -5.55 e 0.8), “Baixo impacto” ( <i>scores</i> entre 0.8 e 1.94), “Médio impacto” ( <i>scores</i> entre 1.94 e 3.5) e “Alto impacto” ( <i>scores</i> entre 3.5 e 5.94). <a href="http://mutationassessor.org/r3/">http://mutationassessor.org/r3/</a>	(Reva et al., 2011)
<i>CADD</i> ( <i>Combined Annotation Dependent Depletion</i> )	Ferramenta que prevê a patogenicidade de variantes pontuais e Indels no genoma humano, contabilizando a raridade do alelo e integrando várias anotações e <i>scores</i> numa única unidade métrica. Este preditor fornece um <i>ranking</i> em vez de uma classificação de predição: <i>scores</i> mais altos têm maior probabilidade de serem deletérios. Como <i>cut-off</i> utilizam-se valores acima de 15. <a href="https://cadd.gs.washington.edu/">https://cadd.gs.washington.edu/</a>	(Kircher et al., 2014)
<i>Alamut Visual Plus</i>	<i>NNSPLICE</i>	Estes preditores preveem os efeitos das variantes em (Reese et al., 1997)
	<i>GeneSplicer</i>	alterarem os locais de <i>splicing</i> , através de abordagens que (Perteza et al., 2001)
	<i>MaxEntScan</i>	modelam sequências e motivos envolvidos no <i>splicing</i> do (Yeo e Burge, 2004)
	<i>Human Splice Finder</i>	RNA. As predições são expressas em percentagem e são determinadas pela diferença entre os <i>scores</i> nativo vs. alterado. (Desmet et al., 2009)

Indels: Pequenas inserções ou deleções

## 4.2.4 Estudo do RNA

### 4.2.4.1 Síntese do cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA extraído conforme as instruções dadas pela casa comercial, utilizando o kit *Invitrogen™ SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (ThermoFisher Scientific)*.

### 4.2.4.2 Desenho dos primers

Os primers *forward* e *reverse* foram desenhados utilizando o programa *Primer3plus* (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), de modo a flanquear as sequências de interesse. As sequências dos primers utilizados estão descritas na tabela 14:

**Tabela 14** | Primers utilizados para amplificar os genes *NARS2*, *SURF1* e *DARS2* a partir do cDNA.

cDNA	Sequência 5' → 3'	Temperatura de <i>melting</i>	Tamanho do produto amplificado
<i>NARS2</i> *	F1: GGGCTCTGGAGTGCCTTAG	60.0 °C	616 pb
	R1: CGCTTCACTGCGAATCCT	60.1 °C	
	F2: GCAGATTCAGGCCTTGACAG	60.9 °C	526 pb
	R2: GCCTCCGGCTCTGAGAAT	60.5 °C	
	F3: TGA CTCTGAGGGAGCTGGA	59.6 °C	525 pb
	R3: TTGCCACAGTGCTTCACC	59.4 °C	
	F4: AAGCATCCCAGAACTTCACC	59.1 °C	646 pb
	R4: TTCTTGCGGGAGCTCATC	60.0 °C	
<i>SURF1</i> *	F1: GAAGCCGCTCGCAGAA	59.9 °C	729 pb
	R1: CCATCCCAATGAGGTCCA	60.3 °C	699 pb
	F2: GTGGGGCCTATGTGGTCA	60.3 °C	
	R2: GGCTGGTCTGAGCTCCTG	59.6 °C	
<i>DARS2</i>	F1: GTGCGGAGGAGGCCTTA	59.9 °C	614 pb
	R1: CAAAGGGCAGCTTCTTGC	59.7 °C	605 pb
	F2: ATGTGAAGCCCCTGTGGA	60.0 °C	
	R2: TGTCATTGGGCCAGGAAT	59.8 °C	
	F3: TTCAGGTTGCCCGATGTT	60.0 °C	724 pb
	R3: GCCGATTCCAGCTCTCTG	59.6 °C	668 pb
	F4: GAGTGGTGCTCCGTGACC	60.3 °C	
	R4: TTGCCTGGATTCTTCCA	60.1 °C	

F: *Primer Forward*. R: *Primer Reverse*. pb: pares de base

\* As variantes identificadas nestes genes foram confirmadas por sequenciação de Sanger no DNA genómico.



As zonas de homologia para cada *primer* foram avaliadas por *BLAT* (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) e os seus parâmetros de qualidade foram confirmados pela ferramenta *FastPCR (PrimerDigital)*. Por último, a inexistência de polimorfismos frequentes na zona de hibridização dos *primers* foi verificada através da ferramenta informática *SNPCheck V3* (<https://genetools.org/SNPCheck/snpcheck.htm>).

#### 4.2.4.3 Reação de PCR

Para amplificar as sequências de interesse, foi realizada uma otimização da PCR utilizando um gradiente de temperatura (50, 55, 60 e 65 °C) e duas *mix* comerciais: *ImmoMix Red™ (Bioline)* e *AmpliTaq Gold™ (Thermofisher)*.

O protocolo de amplificação por PCR está esquematizado na figura 7.

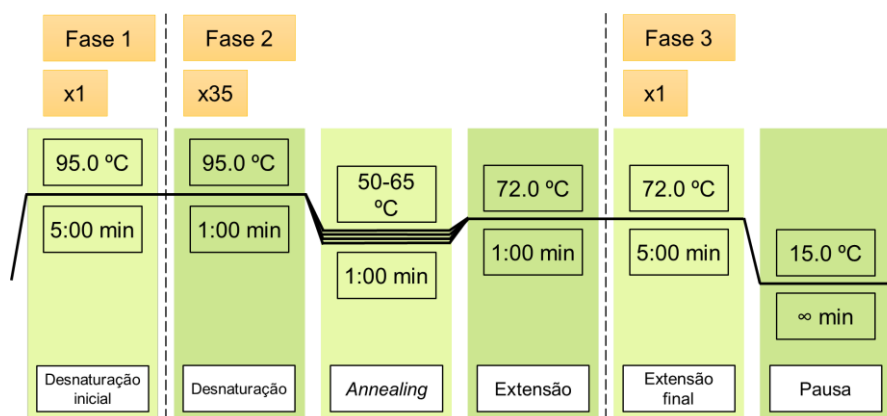


Figura 7 | Representação esquemática do protocolo de otimização da PCR.

Os produtos amplificados foram analisados através de uma eletroforese em gel de agarose a 1% com *GelRed® (Biotium)* e em tampão *Tris-acetate-EDTA (TAE 1x)*. Após a eletroforese, o gel de agarose foi visualizado no equipamento *Gel Doc™ XR System (Bio-Rad)*.

As condições ótimas de amplificação foram registadas e estão descritas na tabela 15:

Tabela 15 | *Mix* e temperatura de *annealing* ótima.

cDNA	Fragmento	Mix	Temperatura ótima de <i>annealing</i>
NARS2	1	<i>ImmoMix Red™ (Bioline)</i>	65 °C
	2	<i>ImmoMix Red™ (Bioline)</i>	60 °C
	3	<i>AmpliTaq Gold™ (Thermofisher)</i>	65 °C
	4	<i>ImmoMix Red™ (Bioline)</i>	65 °C

SURF1	1	<i>AmpliTaq Gold™ (ThermoFisher)</i>	60 °C
	2	<i>AmpliTaq Gold™ (ThermoFisher)</i>	65 °C
DARS2	1	<i>ImmoMix Red™ (Bioline)</i>	65 °C
	2	<i>ImmoMix Red™ (Bioline)</i>	65 °C
	3	<i>ImmoMix Red™ (Bioline)</i>	60 °C
	4	<i>AmpliTaq Gold™ (ThermoFisher)</i>	65 °C

#### 4.2.4.4 Sequenciação de Sanger

Os produtos amplificados foram purificados através do protocolo *ExoSAP (GE Healthcare)*. Assim, a 2 µl do produto PCR amplificado foi adicionado 2 µl de Exo-SAP, seguida de uma incubação a 37° C durante 15 minutos e da inativação da enzima a 80°C durante mais 15 minutos.

Para a sequenciação, foi realizada uma PCR assimétrica nas condições referidas na figura 8, utilizando a *mix comercial BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Version 3.1. (ThermoFisher Scientific)*.

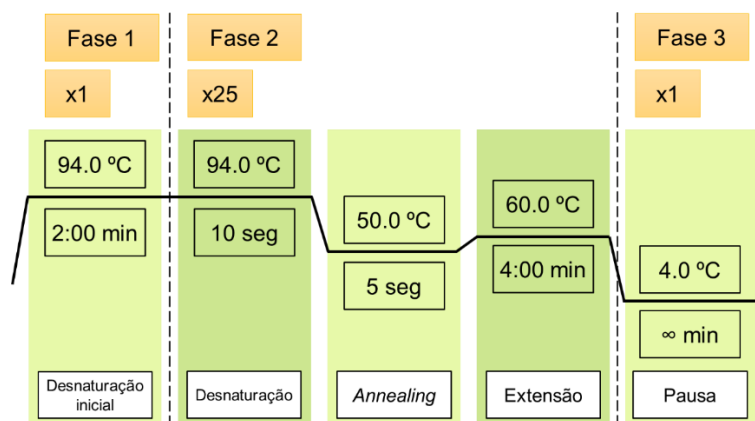


Figura 8 | Representação esquemática do protocolo de PCR de sequenciação.

Foi efetuada uma nova purificação utilizando o Kit *DyeEx 96 Kit (QIAGEN)*, conforme as instruções da casa comercial e a sequenciação foi realizada no sequenciador automático *ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*. A análise dos eletroferogramas obtidos foi realizada no programa informático *FinchTV v.1.4.0 (Geospiza)* e as sequências foram comparadas com a sequência de referência disponibilizada no *Ensembl (https://www.ensembl.org/index.html)*.

## **Capítulo 5**

---

# **Resultados e Discussão**



No presente trabalho foram estudados um total de 23 doentes: 6 com suspeita de doença metabólica (D1 a D5) e 17 com suspeita de doença mitocondrial (D6 a D22). Foi obtido um resultado molecular positivo em 39% (9/23) dos doentes analisados: 3 faziam parte do grupo das doenças metabólicas (D1a, D1b e D2) e 6 doentes faziam parte do grupo das doenças mitocondriais (D12, D13, D15, D20, D21 e D22). As variantes identificadas, descritas na tabela 16, abrangem os seguintes genes: *MCEE* (D1a e D1b), *TCN1* (D2), *MECR* (D12), *VAR2* (D13), *SPG7* (D15), *NARS2* (D20), *SURF1* (D21) e *DARS2* e *KARS1* (D22).

**Tabela 16** | Variantes identificadas nos doentes estudados.

Doente	Gene	Genótipo	Referência
D1a D1b	<i>MCEE</i>	c.139C>T (p.Arg47*) / c.139C>T (p.Arg47*)	(Bikker <i>et al.</i> , 2006)
D2	<i>TCN1</i>	c.271C>T (p.Gln73*) / c.901G>T (p.Asp301Tyr)	(Carmel <i>et al.</i> , 2009)
D12	<i>MECR</i>	c.350G>A (p.Ser117Asn) / c.350G>A (p.Ser117Asn)	Este estudo
D13	<i>VAR2</i>	c.1079C>T (p.Ala360Val) / c.1258G>A (p.Ala420Thr)	Este estudo / (Bruni <i>et al.</i> , 2018)
D15	<i>SPG7</i>	c.1447C>T (p.Gln483*) / c.1447C>T (p.Gln483*)	(Morais <i>et al.</i> , 2017)
D20	<i>NARS2</i>	c.500A>G (p.His167Arg) / c.690-?-959+?del (p.Ala231_Ile320del)	(Mizuguchi <i>et al.</i> , 2017) / Este estudo
D21	<i>SURF1</i>	c.19_35dup17 (p.Ala13Cysfs*65) / c.845_846del (Ser282Cysfs*9)	(Tiranti <i>et al.</i> , 1998)
D22	<i>DARS2</i> <i>KARS1</i>	c.90C>A (p.Tyr30*) c.1609C>T (p.Arg537Trp)	(Stellingwerff <i>et al.</i> , 2021) Este estudo

O espectro mutacional inclui 4 variantes *nonsense*, 6 variantes *missense*, 2 variantes *frameshift* e 1 deleção em grande escala. Destas variantes, 9 estavam descritas como patogénicas, incluindo uma como polimorfismo funcional (ou seja, uma variante que está presente numa frequência populacional superior a 1% mas que leva a uma certa diminuição da atividade da proteína resultante, podendo causar doença quando presente em heterozigotia composta com uma mutação que origina a perda total da função da proteína).

Adicionalmente, neste trabalho estão reportadas duas novas variantes nunca anteriormente descritas, tendo sido categorizadas, segundo as normas do ACMG, como variantes de significado indeterminado ([c.350G>A (p.Ser117Asn) no gene *MECR* e c.1079C>T (p.Ala360Val) no gene *VAR2*].

A maioria dos doentes deste estudo (14/23) permaneceu com um diagnóstico molecular indeterminado. Apesar do conhecido impacto da NGS na capacidade de identificar a causa molecular adjacente às doenças genéticas, esta abordagem origina informação de grande complexidade e por vezes de difícil interpretação. Em particular, dá-se o exemplo do elevado número de variantes de significado indeterminado que são obtidas e que levantam dificuldades na interpretação dos resultados (Petersen *et al.*, 2017). De facto, na literatura, está descrito que apenas 25 a 40% das análises do mendelioma têm um diagnóstico molecular definitivo. Nos dias de hoje, esta percentagem tem aumentado ligeiramente devido à utilização de novas ferramentas de análise como o *Exomiser*, o *Face2Gene* ou o *ClinPhen*, que tornam a interpretação dos resultados mais fácil por priorizarem determinadas variantes conforme os fenótipos reportados (Ji *et al.*, 2021). Além disso, com a implementação das técnicas de WES e WGS, têm surgido novos genes associados a doenças e também se tem valorizado variantes em regiões não codificantes, como as regiões reguladoras e intrónicas profundas que podem interromper motivos reguladores da transcrição e do *splicing* (Vaz-Drago *et al.*, 2017). Desta forma, muitos destes doentes prosseguem o seu estudo com a sequenciação do exoma ou genoma completo. Esta prática era aplicada quase exclusivamente no âmbito investigacional, uma vez que devido à colossal quantidade de informação gerada, esta técnica possui uma interpretação extremamente complexa e demorada (Lappalainen *et al.*, 2019). No entanto, apesar da análise do exoma clínico ser realizada rotineiramente em muitos laboratórios, a abordagem por WES ou WGS já começa a ser efetuada, uma vez que estas técnicas demonstraram ser ferramentas importantes na identificação de novas variantes genéticas, especialmente quando as variantes estão relacionadas com fenótipos não tradicionais (Dillon *et al.*, 2018).

Os casos positivos deste estudo serão discutidos de seguida.

## 5.1 Gene *MCEE*

Os doentes D1a e D1b são dois irmãos sírios que apresentavam um diagnóstico bioquímico de acidúria metilmalónica isolada. A acidúria metilmalónica é uma doença do metabolismo da cobalamina e da via metabólica que transforma o propionil-CoA em succinil-CoA, um componente essencial no ciclo do TCA (J. Fraser e Venditti, 2016). Clinicamente, este tipo de acidúria orgânica expressa-se em duas formas: acidúria metilmalónica isolada e acidúria metilmalónica com homocistinúria, que são causadas, respetivamente, por mutações em diferentes genes (Baumgartner *et al.*, 2014).

Cerca de 60% dos casos de acidúria metilmalónica isolada estão associados a mutações no gene *MMUT* (OMIM \*609058), seguido de casos associados a mutações nos genes *MMAA* (OMIM \*607481) ou *MMAB* (OMIM \*607568) (Forny e Grunewald, 2020). Casos menos frequentes têm como etiologia mutações no gene *MCEE* (OMIM \*608419) e estão associados a formas menos severas e com expressão fenotípica mais tardia (Zhou *et al.*, 2018).

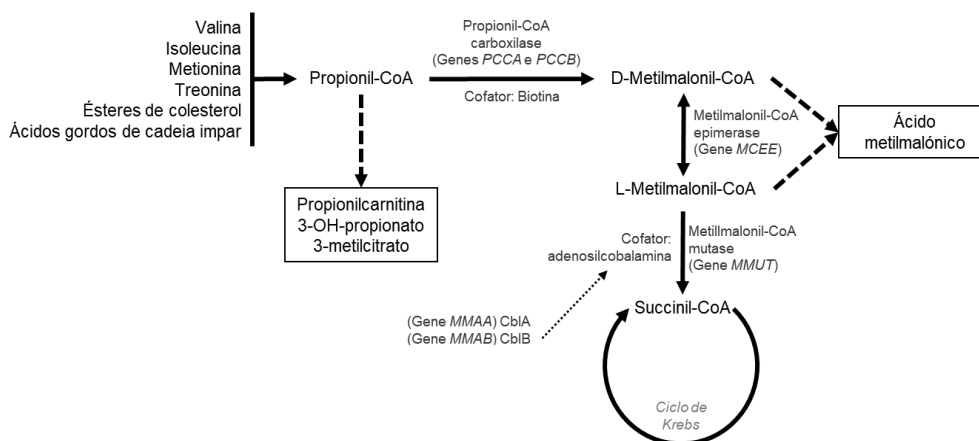
A análise do exoma clínico destes dois irmãos identificou a variante patogénica c.139C>T em aparente homozigotia no gene *MCEE* (tabela 17), que origina um codão de terminação prematuro.

**Tabela 17** | Variante identificada em aparente homozigotia no gene *MCEE*.

<b>Transcrito</b>	NM_032601.4	<b>dbSNP</b>	rs111033538
<b>Alteração nucleotídica</b>	c.139C>T	<b>Alteração proteica</b>	p.Arg47*
<b>Frequência populacional</b>	<i>GnomAD</i> (Geral): 0.0269% <i>GnomAD</i> (ENF): 0.0489%	<b>Preditores de patogenicidade</b>	<i>MutationTaster</i> : 1.000 (A) <i>CADD</i> : 36
<b>HGMD</b>	Descrita por Bikker <i>et al.</i> , 2006 como variante causadora de doença		

A: automaticamente causador de doença; ENF: população europeia não finlandesa. Referência do genoma: hg19/GRCh37

O gene *MCEE* é responsável por codificar a enzima metilmalonil-CoA epimerase, que catalisa a interconversão de D-metilmalonil-CoA em L-metilmalonil-CoA (figura 9). A variante c.139C>T (p.Arg47\*) é frequentemente encontrada neste gene em doentes com acumulação moderada de ácido metilmalónico. Noutras situações menos comuns, esta acumulação pode vir acompanhada de atrasos leves no desenvolvimento psicomotor e/ou comprometimento do sistema neurológico (Abily-Donval *et al.*, 2017). Uma vez que esta variante leva à presença de um codão de terminação prematuro, o transcrito resultante é instável e rapidamente degradado pela via do *Nonsense mediated decay* (NMD) (Bikker *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2010).

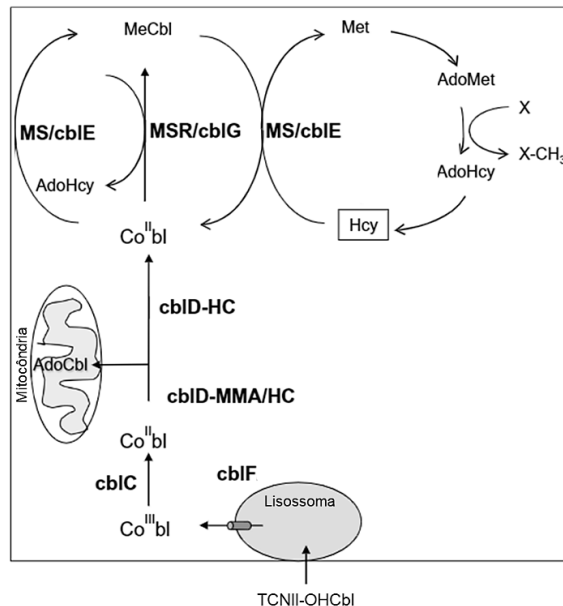


**Figura 9** | Via metabólica do ácido propiónico.  
CoA: Coenzima A; CblA: Cobalamina A; CblB: Cobalamina B.

## 5.2 Gene *TCN1*

A vitamina B12, também conhecida como cobalamina, é uma vitamina hidrossolúvel crucial para o funcionamento do sistema nervoso e para a produção de eritrócitos. O ser humano não consegue sintetizar esta vitamina, estando totalmente dependente de fontes alimentares para a sua introdução no organismo (Romain *et al.*, 2016).

Após a sua ingestão, a cobalamina liga-se à haptocorrina / TCNI, codificada pelo gene *TCN1* (OMIM \*189905), que a impede de ser hidrolisada pelo ambiente ácido do estômago (Akkouh *et al.*, 2018). Uma vez no duodeno, a haptocorrina é hidrolisada e a cobalamina liga-se ao fator intrínseco, codificado pelo gene *CBLIF* (OMIM \*609342), que a transporta até ao íleo. Aqui, a cobalamina é absorvida pelas células intestinais e é subsequentemente libertada na corrente sanguínea, onde vai ser transportada num complexo formado com a transcobalamina II / TCNII, codificada pelo gene *TCN2* (Brasil *et al.*, 2018). Outros genes estão envolvidos no transporte e no processamento intracelular da cobalamina, que originam não só a síntese de metilcobalamina mas também de adenosilcobalamina, o cofator da metilmalonil-CoA mutase (figura 10). Defeitos nesta via originam normalmente um aumento combinado do ácido metilmalónico e da homocisteína (Huemer *et al.*, 2017).



**Figura 10** | Processamento intracelular da cobalamina.

A negrito estão designados os tipos de acidúrias resultantes dos defeitos em genes responsáveis pelo processamento e transporte da cobalamina. AdoCbl: Adenosilcobalamina; AdoHcy: Adenosil-homocisteína; AdoMet: Adenosilmetionina; cblC: Acidúria metilmalónica e homocistinúria do tipo CblC, devido a defeitos no gene *MMACHC*; cblD-HC: Homocistinúria isolada do tipo CblD, devido a defeitos no gene *MMADHC*; cblD-MMA/HC: Acidúria metilmalónica e homocisteinúria do tipo CblD, devido a defeitos no gene *MMADHC*; cblF: Acidúria metilmalónica e homocisteinúria do tipo CblF, devido a defeitos no gene *LMBRD1*; Co<sup>II</sup>Cbl: Cobalamina em estado de oxidação II; Co<sup>III</sup>Cbl: Cobalamina em estado de oxidação III; Hcy: Homocisteína; MeCbl: Metilcobalamina; Met: Metionina; MS/cblE: Homocistinúria e anemia megaloblástica do tipo cblE, devido a defeitos no gene da metionina sintetase - *MTR*; MSR/cblG: cblG: Homocistinúria e anemia megaloblástica do tipo cblE, devido a defeitos no gene da metionina sintetase redutase - *MTRR*; TCNII-OHCbl: Complexo TCNII-cobalamina. Adaptado de (Huemer *et al.*, 2017).



Mutações no gene *TCN2* (OMIM \*613441) são um dos defeitos mais comuns do metabolismo da cobalamina mas, embora mais raras, já foram descritas situações onde o défice de vitamina B12 se deve a variantes no gene *TCN1*. Neste gene, variantes em heterozigotia estão associadas a défices moderados de TCNI, enquanto que variantes homozigóticas ou heterozigóticas compostas tem sido associadas a défices mais graves desta proteína (Brasil *et al.*, 2018; Carmel *et al.*, 2009).

O doente D2 é uma criança do sexo masculino que manifestou um défice neonatal de vitamina B12 e acidúria metilmalónica. A suplementação oral com vitamina B12 mostrou-se ineficaz e apenas se obteve uma resposta parcial com suplementação intramuscular. A análise do exoma clínico deste doente identificou, em heterozigotia, as variantes c.271C>T (p.Gln73\*) e c.901G>T (p.Asp301Tyr) no gene *TCN1*, descritas na tabela 18.

Até à data, apenas duas variantes patogénicas [c.217C>T (p.Gln73\*) e c.172delG (p.Val58Cysfs\*14)] e dois polimorfismos funcionais [c.104G>A (p.Arg35His) e c.901G>T (p.Asp301Tyr)] foram descritos no gene *TCN1*. Tanto a variante *nonsense* c.217C>T (p.Gln73\*) como a variante *frameshift* c.172delG (p.Val58Cysfs\*14) causam a degradação prematura dos transcritos por NMD (Carmel *et al.*, 2009), sendo fácil de perceber o mecanismo de patogénese. Por outro lado, os polimorfismos funcionais estão presentes numa frequência de cerca de 9% nas bases de dados *ExAc* e *GnomAD* e, quando identificados em heterozigotia composta com estas variantes patogénicas, causam défices severos dos níveis de TCNI (Brasil *et al.*, 2018; Carmel *et al.*, 2009). Duas meta-análises distintas realizadas na população indiana e nas populações dinamarquesa e islandesa permitiram reforçar esta associação (Grarup *et al.*, 2013; Nongmaithem *et al.*, 2017).

**Tabela 18** | Variantes identificadas em heterozigotia no gene *TCN1*.

<b>Transcrito</b>	NM_001062.4	NM_001062.4
<b>Alteração nucleotídica</b>	c.217C>T	c.901G>T
<b>Alteração proteica</b>	p.Gln73*	p.Asp301Tyr
<b>dbSNP</b>	rs377535980	rs34324219
<b>Frequência populacional</b>	<i>GnomAD</i> (Geral): 0.00602% <i>GnomAD</i> (ENF): 0.00853%	<i>GnomAD</i> (Geral): 8.65% <i>GnomAD</i> (ENF): 11.46%
<b>Preditores de patogenicidade</b>	<i>MutationTaster</i> : 1.000 (A) <i>CADD</i> : 26.6	<i>SIFT</i> : 0.061 (T) <i>PolyPhen-2</i> : 0.795 (PD) <i>MutationAssessor</i> : 2.22 (M) <i>MutationTaster</i> : 0.999 (PM) <i>CADD</i> : 22.6
<b>HGMD</b>	Descrita por Carmel <i>et al.</i> , 2009 como variante causadora de doença	Descrita por Carmel <i>et al.</i> , 2009 como polimorfismo causador de doença

A: automaticamente causador de doença; ENF: população europeia não finlandesa; M: médio impacto; PD: possivelmente patogénica; PM: polimorfismo; T: tolerada. Referência do genoma: hg19/GRCh37

### 5.3 Gene *MECR*

A síndrome de Leigh (LS), ou encefalopatia aguda necrotizante (OMIM #256000), é a apresentação mais comum de disfunção mitocondrial com início na infância, geralmente antes dos 2 anos de idade (S. Baldo e Vilarinho, 2020). Esta síndrome neurodegenerativa progressiva é caracterizada por um quadro clínico de hipotonia, ataxia, epilepsia, acidose láctica, envolvimento ocular, disfunção respiratória e atraso no desenvolvimento psicomotor (Sofou *et al.*, 2018). Achados típicos em estudos de neuroimagem por ressonância magnética revelam hiperintensidades simétricas nos gânglios da base, em imagens ponderadas em T2 (Lake *et al.*, 2016).

A LS é caracterizada pela sua heterogeneidade genética, devendo-se tanto a defeitos no mtDNA como no nDNA. Em contraste ao mtDNA, onde apenas 14 genes foram relacionados com a LS, no nDNA a LS já foi descrita em mais de 100 genes monogénicos e este número ainda está em expansão nos dias de hoje (Orsucci *et al.*, 2021; Rahman, 2020). Além disso, estão descritos fenótipos clínicos sugestivos de LS, mas cujo envolvimento não se limita ao sistema nervoso central, comprometendo também os sistemas cardíaco, hepático, gastrointestinal ou hematológico. Estes fenótipos são denominados de síndromes do tipo Leigh (Gerards *et al.*, 2016).

A doente D12 foi encaminhada para estudo genético por suspeita de LS. A análise do exoma clínico identificou a variante c.350G>A (p.Ser117Asn) em aparente homozigotia no gene *MECR* (tabela 19).

**Tabela 19** | Variante identificada em aparente homozigotia no gene *MECR*.

<b>Transcrito</b>	NM_016011.5	<b>dbSNP</b>	rs199787758
<b>Alteração nucleotídica</b>	c.350G>A	<b>Alteração proteica</b>	p.Ser117Asn
<b>Frequência populacional</b>	<i>GnomAD</i> (Geral): 0.00358% <i>GnomAD</i> (ENF): ND	<b>Preditores de patogenicidade</b>	<i>SIFT</i> : 0.252 (T) <i>PolyPhen-2</i> : 0.002 (B) <i>MutationAssessor</i> : 1.70 (L) <i>MutationTaster</i> : 0.858 (DC) <i>CADD</i> : 19.33
<b>HGMD</b>	Não descrita	<b>ClinVar</b>	Não descrita

B: benigna; DC: causadora de doença; ENF: população europeia não finlandesa; L: baixo impacto; ND: não descrita; T: tolerada. Referência do genoma: hg19/GRCh37

O gene *MECR* (OMIM \*608205) codifica a enzima mitocondrial trans-2-enoil-CoA redutase, que é responsável pela etapa final da síntese de ácidos gordos (nomeadamente do ácido lipólico). O ácido lipólico, por sua vez, desempenha uma importante função de cofator no metabolismo mitocondrial (Heimer *et al.*, 2016). A

presença de mutações no gene *MECR* foram recentemente descritas como causa de síndromes neurodegenerativas caracterizadas por atrofia ótica e distonia com início na infância. Além disso, análises de neuroimagem por ressonância magnética revelam, em imagens ponderadas em T2, hiperintensidades simétricas nos gânglios basais que mimetizam a LS (Martikainen *et al.*, 2016). Em 2021, Liu e colegas reportaram uma variante em homozigotia no gene *MECR* que originava um fenótipo sem atrofia ótica, descrevendo apenas um quadro clínico de distonia e de hiperintensidade nos gânglios basais sem elevação do lactato (Liu *et al.*, 2021).

Relativamente à variante identificada, esta origina a substituição do aminoácido serina por asparagina no codão 117, situado no domínio catalítico da proteína *MECR*. A serina é moderadamente conservada durante a evolução (figura 11) e há uma pequena diferença físico-química entre estes aminoácidos (diferença de Grantham de 46). Esta variante está presente em bases de dados populacionais numa frequência muito baixa, mas nunca em homozigotia. Também não está descrita na literatura e os preditores de patogenicidade analisados não concordam com o potencial impacto desta variante. Estes fatores não são suficientes para determinar o papel patogénico desta variante e assim, segundo as *guidelines* do ACMG, classifica-se como variante de significado indeterminado, sendo futuramente necessário realizar estudos funcionais para determinar o papel desta alteração na proteína.

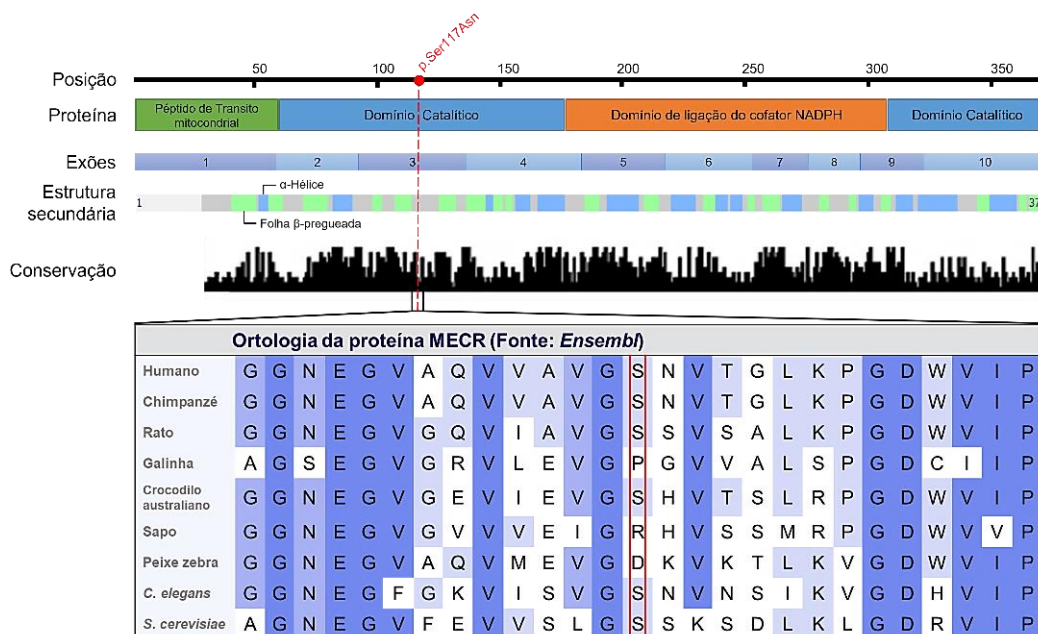


Figura 11 | Contexto estrutural e conservação evolutiva do resíduo de serina no codão 117 da proteína MECR.

## 5.4 Gene *VAR2*

Nos últimos anos, têm sido reportados um número crescente de DM associadas a variantes nos aminoacil-tRNA sintetases mitocondriais (mt-aARS), enzimas essenciais à síntese dos polipéptidos mitocondriais visto catalisarem a ligação dos aminoácidos aos seus respetivos tRNAs (Rajendran *et al.*, 2018). Apesar da descrição inicial de uma correlação genótipo/fenótipo, recentemente, variantes patogénicas no mesmo mt-aARS têm sido associadas a fenótipos clínicos muito distintos. É o exemplo dos genes *AARS2* (OMIM \*612035), cujos defeitos estão associados a cardiomiopatia infantil ou a leucodistrofia e disfunção ovárica; ou então o gene *FARS2* (OMIM \*611592), cujos défices são caracterizados por encefalopatia epilética ou por paraplegia espástica (Bruni *et al.*, 2018; Diodato *et al.*, 2014).

O gene *VAR2* (OMIM \*612802) é também um gene bastante heterogéneo fenotipicamente. Este gene codifica a proteína valil-tRNA sintetase, uma enzima que está envolvida na ligação da valina ao seu tRNA cognato e mutações neste gene estão associadas a fenótipos como a encefalomiopatia mitocondrial e mais recentemente a cardiomiopatia hipertrófica (Diodato *et al.*, 2014; Kušíková *et al.*, 2021).

A doente D13 era um bebé do sexo feminino com restrição do desenvolvimento fetal e nascimento prematuro. Alguns dias após o seu nascimento desenvolveu um quadro de hipotonia, acidose metabólica, hiperlactacidemia e a análise por ultrassonografia revelou uma cardiomiopatia hipertrófica, quadro que levou à morte da doente aos 40 dias de vida.

Após análise do exoma clínico, foram identificadas as variantes c.1079C>T (p.Ala360Val) e c.1258G>A (p.Ala420Thr) em heterozigotia no gene *VAR2* (tabela 20). A variante c.1258G>A (p.Ala420Thr) já tinha sido reportada em 4 doentes com um quadro de hipotonia, falência respiratória, acidose metabólica severa, hiperlactacidemia e cardiomiopatia hipertrófica. Além disso, 3 destes doentes faleceram nos primeiros meses de vida (Bruni *et al.*, 2018; Kušíková *et al.*, 2021). Por outro lado, a variante c.1079C>T (p.Ala360Val) não está reportada na literatura nem em qualquer base de dados populacional.

**Tabela 20** | Variantes identificadas em heterozigotia no gene *VAR2*.

<b>Transcrito</b>	NM_001167734.2	NM_001167734.2
<b>Alteração nucleotídica</b>	c.1079C>T	c.1258G>A
<b>Alteração proteica</b>	p.Ala360Val	p.Ala420Thr
<b>dbSNP</b>	.	rs202201763
<b>Frequência populacional</b>	<i>GnomAD</i> (Geral): ND <i>GnomAD</i> (ENF): ND	<i>GnomAD</i> (Geral): 0.0381% <i>GnomAD</i> (ENF): 0.0183%

<b>Preditores de patogenicidade</b>	<i>SIFT</i> : 0.053 (T)	<i>SIFT</i> : 0.002 (D)
	<i>PolyPhen-2</i> : 0.162 (B)	<i>PolyPhen-2</i> : 1.000 (PP)
	<i>MutationAssessor</i> : 1.17 (L)	<i>MutationAssessor</i> : 3.85 (H)
	<i>MutationTaster</i> : 0.999 (N)	<i>MutationTaster</i> : 0.999 (DC)
	<i>CADD</i> : 22.9	<i>CADD</i> : 29.3
<b>HGMD</b>	Não descrita	Descrita por Bruni <i>et al.</i> , 2018 como causadora de doença
<b>ClinVar</b>	Não descrita	Patogénica

B: benigna; D: deletéria; DC: causadora de doença; ENF: população europeia não finlandesa; H: alto impacto; L: baixo impacto; N: neutra; PP: provavelmente patogénica; T: tolerada. Referência do genoma: hg19/GRCh37

A variante c.1079C>T origina a substituição do aminoácido alanina por valina no codão 360 da proteína VARS2. A alanina é fracamente conservada durante a evolução (figura 12) e há uma pequena diferença físico-química entre estes aminoácidos (diferença de Grantham de 64). Este resíduo está situado no domínio com atividade de tRNA sintetase, mais especificamente, no domínio de edição, que é responsável por evitar/corrigir acetilações dos tRNAs com aminoácidos não cognatos. Estudos anteriores têm indicado que a maioria dos doentes com variantes nessa região têm um maior comprometimento clínico e um pior prognóstico (Baertling *et al.*, 2017; Bruni *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2018).

Esta variante é extremamente rara na população e, apesar de apenas o preditor *CADD* sugerir que esta substituição seja deletéria, esta variante foi aqui identificada juntamente com uma variante patogénica recorrente em doentes com um quadro clínico muito semelhante ao da D13. Segundo as *guidelines* do ACMG, a variante c.1079C>T classifica-se como variante de significado indeterminado, mas mesmo que não cause uma perda completa da função da enzima, esta provavelmente resulta na diminuição da sua atividade, resultando em doença quando presente em heterozigotia composta com um alelo que origina a perda total da função da proteína.

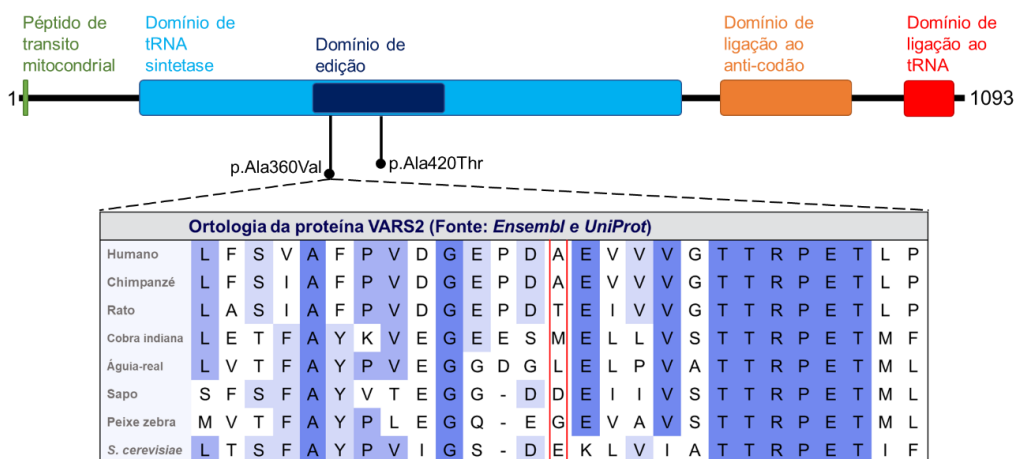


Figura 12 | Contexto estrutural e conservação evolutiva do resíduo de alanina no codão 360 da proteína VARS2.

## 5.5 Gene *SPG7*

A doente D15 trata-se de uma mulher com 67 anos, natural de Cabo Verde, que apresenta um quadro de paraparésia espástica, ataxia cerebelosa e oftalmoplegia externa progressiva crónica. A análise do seu mtDNA revelou a presença de deleções múltiplas.

Na análise do exoma clínico da D15, foi identificada em aparente homozigotia a variante patogénica c.1447C>T (p.Gln483\*) no gene *SPG7* (tabela 21), um dos mais de 50 genes que causam paraparésia espástica. As paraplegias espásticas são um grupo de doenças genéticas neurodegenerativas que se caracterizam principalmente por espasticidade e fraqueza dos membros inferiores. Têm normalmente uma expressão fenotípica tardia, uma vez que são consequências da degeneração progressiva dos axónios motores (Fink, 2013).

**Tabela 21** | Variante identificada em aparente homozigotia no gene *SPG7*.

<b>Transcrito</b>	NM_003119.4	<b>dbSNP</b>	rs562890289
<b>Alteração nucleotídica</b>	c.1447C >T	<b>Alteração proteica</b>	p.Gln483*
<b>Frequência populacional</b>	<i>GnomAD</i> (Geral): 0.00248% <i>GnomAD</i> (AFR): 0.0241%	<b>Preditores de patogenicidade</b>	<i>MutationTaster</i> : 1.000 (A) <i>CADD</i> : 58
<b>HGMD</b>	Descrita por Morais <i>et al.</i> , 2017 como variante causadora de doença		

A: automaticamente causador de doença; AFR: população africana. Referência do genoma: hg19/GRCh37

O gene *SPG7* (OMIM \*602783) codifica a proteína paraplegina, uma proteína localizada na membrana mitocondrial interna e que está envolvida no processamento de outras proteínas mitocondriais (Wedding *et al.*, 2014). A paraplegia espástica do tipo 7 (OMIM #607259) é uma doença autossómica recessiva provocada por variantes neste gene e o envolvimento do cerebelo faz parte do fenótipo central desta patologia (Morais *et al.*, 2017), quadro que esta doente partilha. Além disso, uma vez que a paraplegina está envolvida no processamento das proteínas que são importadas para a mitocôndria, o seu défice pode causar indiretamente deleções múltiplas do mtDNA, pois pode impedir o processamento correto das proteínas envolvidas na comunicação intergenómica (Wedding *et al.*, 2014).

## 5.6 Genes *NARS2*, *SURF1*, *DARS2* e *KARS1*

Os doentes D20, D21 e D22 são doentes cujos fenótipos clínicos são compatíveis com disfunção mitocondrial e cuja análise primária do painel de NGS (dirigido a genes nucleares responsáveis por doenças mitocondriais) apenas identificou um alelo suspeito que, apesar de estar descrito na literatura como patogénico, estava presente em genes com um padrão de transmissão autossómico recessivo. Por esta razão, foi realizada a análise do exoma clínico mas esta não revelou mais variantes de interesse. Procedeu-se assim ao estudo do respetivo cDNA dos genes candidatos, o qual permitiu identificar o segundo alelo causal em dois dos três doentes estudados.

### 5.6.1 Gene *NARS2*

A doente D20 é um recém-nascido do sexo feminino com restrição do crescimento intrauterino e nascimento prematuro. Após o seu nascimento, desenvolveu um quadro de disfunção mitocondrial grave, apresentando acidose láctica, hiperaminoacidúria, cardiopatia congénita, diabetes neonatal e onfalocele. O perfil dos ácidos orgânicos revelou a presença de uma grande quantidade do ácido 3-hidroxi-butírico e em menor quantidade os metabolitos intermediários do ciclo do TCA. O seu quadro clínico foi agravando progressivamente até o seu desfecho fatal.

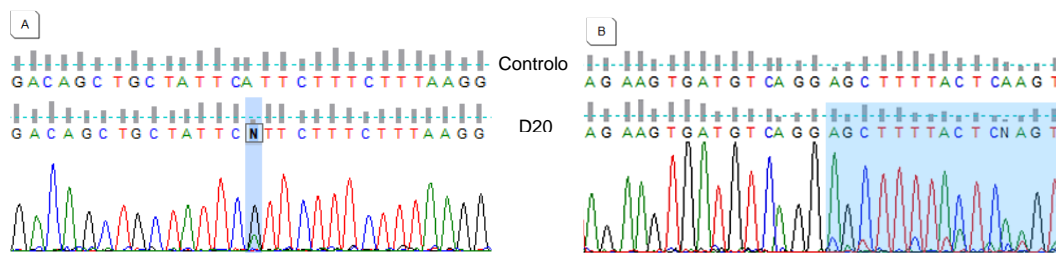
Através da análise do painel de doenças mitocondriais da D20, identificou-se a variante patogénica c.500A>G (p.His167Arg) em heterozigotia no gene *NARS2* (tabela 22). Este gene é responsável por codificar a enzima asparaginil-tRNA sintetase, um mt-aARS que é importado para a mitocôndria a fim de catalisar a ligação da aspargina à respetiva molécula de tRNA (M. Simon *et al.*, 2015). Variantes patogénicas neste gene são uma das causas de disfunção do complexo OXPHOS e resultam em doenças neurodegenerativas como a paraplegia espástica, a LS e a síndrome de Alpers (Štěrbová *et al.*, 2021).

**Tabela 22** | Variante identificada em heterozigotia no gene *NARS2*.

<b>Transcrito</b>	NM_024678.6	<b>dbSNP</b>	rs750594551
<b>Alteração nucleotídica</b>	c.500A>G	<b>Alteração proteica</b>	p.His167Arg
<b>Frequência populacional</b>	<i>GnomAD</i> (Geral): 0.000812% <i>GnomAD</i> (ENF): ND	<b>Preditores de patogenicidade</b>	<i>SIFT</i> : 0.001 (D) <i>PolyPhen-2</i> : 0.995 (PP) <i>MutationAssessor</i> : 1.54 (L) <i>MutationTaster</i> : 0.999 (DC) <i>CADD</i> : 25.4
<b>HGMD</b>	Descrita por Mizuguchi <i>et al.</i> , 2017 como variante causadora de doença		

D: deletéria; DC: causadora de doença; ENF: população europeia não finlandesa; L: baixo Impacto; ND: não descrito; PP: Provavelmente patogénica. Referência do genoma: hg19/GRCh37

O estudo do cDNA do gene *NARS2* veio revelar uma grande deleção em heterozigotia que abrange os exões 7, 8 e 9 [c.690-?\_959+?del (p.Ala231\_Ile320del)] (figura 13), confirmando o diagnóstico molecular inicial desta doente.



**Figura 13** | Eletoferograma das variantes identificadas no gene *NARS2*. **A)** Variante patogénica no exão 4 c.500A>G (p.His167Arg), em heterozigotia (gDNA). **B)** Deleção dos exões 7, 8 e 9 [c.690-?\_959+?del (p.Ala231\_Ile320del)], em heterozigotia (cDNA).

### 5.6.2 Gene *SURF1*

A doente D21 é uma criança do sexo feminino de 4 anos que apresenta hipotonia grave, tremor, atraso do desenvolvimento psicomotor, tetralogia de Fallot e alterações na ressonância magnética cerebral como a presença de hiperintensidades simétricas nos gânglios basais, em imagens ponderadas em T2. A irmã desta doente tem 2 anos e apresenta uma história clínica semelhante.

Nesta doente, foi inicialmente identificada em heterozigotia apenas a variante patogénica c.845\_846del (Ser282Cysfs\*9) no gene *SURF1* (tabela 23). O gene *SURF1* (OMIM \*185620) codifica um fator de *assembly* que é responsável não só pela montagem como também pela manutenção da estabilidade do complexo enzimático citocromo c oxidase (complexo IV), um componente essencial da CRM (Lee e Chiang, 2021). A presença de variantes patogénicas neste gene está associada a défices do complexo IV da CRM (que por norma se exprimem fenotipicamente pela LS) ou à doença de Charcot-Marie-Tooth (Echaniz-Laguna *et al.*, 2013).

**Tabela 23** | Variante identificada em heterozigotia no gene *SURF1*.

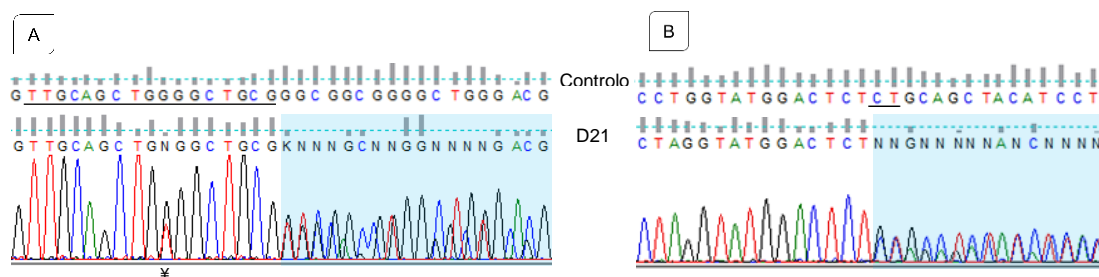
<b>Transcrito</b>	NM_003172.4	<b>dbSNP</b>	rs782316919
<b>Alteração nucleotídica</b>	c.845_846del	<b>Alteração proteica</b>	p.Ser282Cysfs*9
<b>Frequência populacional</b>	<i>GnomAD</i> (Geral): 0.00958% <i>GnomAD</i> (ENF): 0.0148%	<b>Preditores de patogenicidade</b>	<i>MutationTaster</i> : 0.999 (DC)
<b>HGMD</b>	Descrita por Tiranti <i>et al.</i> , 1998 como variante causadora de doença		

D: deletória; DC: causadora de doença; ENF: população europeia não finlandesa; L: baixo Impacto; ND: não descrito; PP: Provavelmente patogénica. Referência do genoma: hg19/GRCh37



O estudo do cDNA desta doente revelou uma deleção em heterozigotia que abrange as últimas 5 bases da região 5' não traduzida e o exão 1. Assim, efetuou-se por sequenciação de Sanger o estudo do gDNA, que permitiu identificar em heterozigotia uma duplicação *frameshift* de 17 pares de base [c.19\_35dup17 (p.Ala13Cysfs\*65)], descrita pela primeira vez por Tiranti e colegas e que causa o *skipping* do exão 1 (Tiranti *et al.*, 1998). As dificuldades associadas à deteção de variações do número de cópias através de abordagens por NGS já foram descritas na literatura (Yamamoto *et al.*, 2016), sendo este caso e o da doente D20 um exemplo disso. Apesar desta duplicação não ser em grande escala, o elevado conteúdo de citosinas e guaninas presente neste gene (e principalmente no exão 1) origina naturalmente uma menor cobertura da sequenciação, dificultando a deteção de variantes deste tipo.

Estas variantes (figura 14A e 14B) são compatíveis com LS e o estudo molecular da irmã por sequenciação de Sanger revelou a presença do mesmo genótipo.



**Figura 14** | Eletroferograma das variantes identificadas no gene *SURF1*.

**A)** Duplicação c.19\_35dup17 (p.Ala13Cysfs\*65), em heterozigotia (gDNA). Simbolizado com ¥ está representado o polimorfismo c.28G>T (Gly10Trp). **B)** Deleção c.845\_846del (p.Ala13Cysfs\*65), em heterozigotia (gDNA).

### 5.6.3 Genes *DARS2* e *KARS1*

A leucoencefalopatia com envolvimento do tronco cerebral e da medula e com lactato aumentado (OMIM #611105) é uma doença autossómica recessiva que foi identificada em 2003 como um novo tipo de leucodistrofia, apresentando padrões altamente característicos em análises de neuroimagem por ressonância magnética, nomeadamente por apresentar lesões simétricas na substância branca periventricular e profunda e também no tronco encefálico e medula espinhal (Scheper *et al.*, 2007). Esta leucodistrofia é causada por variantes patogénicas no gene *DARS2* (OMIM \*610956), que codifica a enzima aspartil-tRNA sintetase. Os indivíduos afetados por défices deste mt-aARS apresentam também ataxia cerebelar, espasticidade e atraso no desenvolvimento psicomotor (Stellingwerff *et al.*, 2021).

O doente D22 é uma criança do sexo masculino com hiperlactacidemia, hiperalaninemia, ataxia e hipotonia. O perfil dos ácidos orgânicos revelou a presença de

uma quantidade moderada de ácido láctico e do ácido 3-hidroxi-butírico e uma quantidade vestigial dos metabolitos intermediários do ciclo do TCA. Realizou uma ressonância magnética no ano anterior, mas esta não identificou alterações relevantes. Inicialmente, a análise molecular identificou apenas a variante c.90C>A (p.Tyr30\*) no gene *DARS2* (figura 15 e tabela 24), e o estudo do cDNA não permitiu identificar a segunda variante causal neste gene.

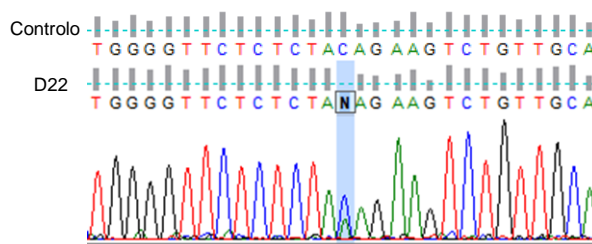


Figura 15 | Eletoferograma da variante c.90C>A (p.Tyr30\*) identificada em heterozigotia no cDNA do gene *DARS2*.

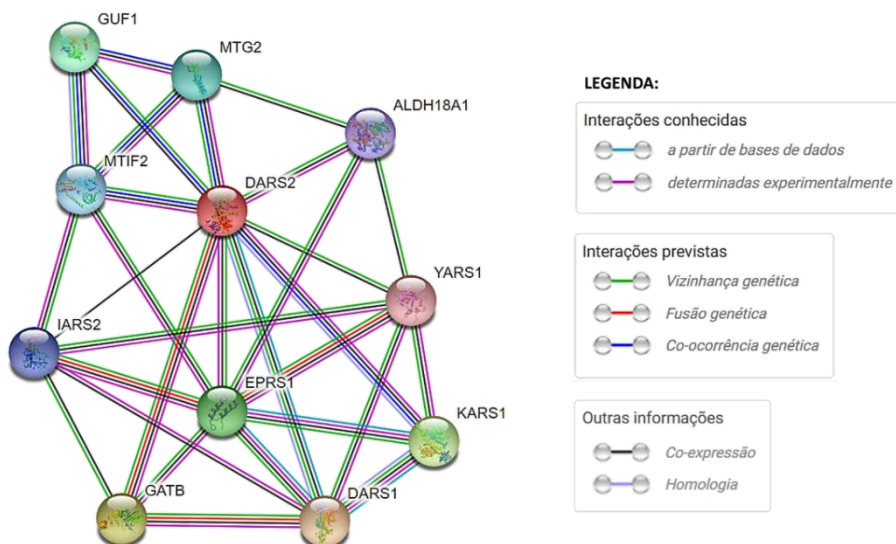
Tabela 24 | Variante identificada em heterozigotia no gene *DARS2*.

<b>Transcrito</b>	NM_018122.5	<b>dbSNP</b>	rs959382650
<b>Alteração nucleotídica</b>	c.90C>A	<b>Alteração proteica</b>	p.Tyr30*
<b>Frequência populacional</b>	<i>GnomAD</i> (Geral): ND <i>GnomAD</i> (ENF): ND	<b>Preditores de patogenicidade</b>	<i>MutationTaster</i> : 1.000 (A) <i>CADD</i> : 32
<b>HGMD</b>	Descrita por Stellingwerff <i>et al.</i> , 2021 como variante causadora de doença		

A: automaticamente causador de doença; ENF: população europeia não finlandesa; ND: não descrito. Referência do genoma: hg19/GRCh37

Duas hipóteses podem ser formuladas para explicar o mecanismo de patogénese aqui envolvido. A primeira incide no facto de poderem existir variantes adicionais em genes que interagem com o gene *DARS2* e a segunda hipótese relaciona-se com o facto de poderem existir variantes num gene que não está presente no painel do exoma clínico (Papadimitriou *et al.*, 2019).

A primeira hipótese parece ser a mais provável e durante uma segunda reanálise do exoma clínico, a consulta da plataforma STRING (disponível em <https://string-db.org/>) revelou que o gene *DARS2* pode interagir com os genes *ALDH18A1*, *DARS1*, *EPRS1*, *GATB*, *GUF1*, *IARS2*, *KARS1*, *MTIF2*, *MTG2* e *YARS1* (figura 16).



**Figura 16** | Rede de interações genéticas associadas ao gene *DARS2*.

Dentro destes genes, destaca-se o gene *KARS1* (OMIM \*601421), outro gene cuja patogénese envolve leucoencefalopatia e no qual se identificou em heterozigotia a variante c.1609C>T (p.Arg537Trp). Esta variante está descrita no ClinVar (VCV001682412.1) como variante de significado indeterminado, situa-se num resíduo altamente conservado durante a evolução e possui uma frequência rara na população. Além disso, todos os preditores de patogenicidade analisados sugerem que esta variante tem um papel deletério (tabela 25).

**Tabela 25** | Variante identificada em heterozigotia no gene *KARS1*.

<b>Transcrito</b>	NM_001130089	<b>dbSNP</b>	rs1442188504
<b>Alteração nucleotídica</b>	c.1609C>T	<b>Alteração proteica</b>	p.Arg537Trp
<b>Frequência populacional</b>	<i>GnomAD</i> (Geral): 0.00106% <i>GnomAD</i> (ENF): 0.00232%	<b>Preditores de patogenicidade</b>	<i>SIFT</i> : 0.000 (D) <i>PolyPhen-2</i> : 1.000 (PP) <i>MutationAssessor</i> : 4.30 (H) <i>MutationTaster</i> : 0.999 (DC) <i>CADD</i> : 31
<b>HGMD</b>	Não descrita	<b>ClinVar</b>	Classificada como variante de significado indeterminado

D: deletéria; DC: causadora de doença; ENF: população europeia não finlandesa; H: alto impacto; PP: provavelmente patogénica. Referência do genoma: hg19/GRCh37

Esta interação entre proteínas já tinha sido explorada anteriormente na literatura e pode reforçar esta hipótese, uma vez que estas enzimas podem formar, juntamente com outras aminoacil-tRNAs sintetases, um complexo multienzimático envolvido na síntese de aminoacil-tRNAs mitocondriais e nucleares (Quevillon *et al.*, 1999; Robinson *et al.*, 2000).



## **Capítulo 5**

---

### **Conclusões e Perspetivas Futuras**



O diagnóstico molecular de DR tem profundas implicações para os doentes e as suas famílias, não só por oferecer um diagnóstico pré-natal e um aconselhamento genético mais preciso, mas também por melhorar muitas vezes o prognóstico através da definição das melhores opções terapêuticas. A NGS tem tido grande impacto no diagnóstico molecular de várias doenças genéticas mendelianas, tal como as doenças metabólicas e as citopatias mitocondriais, por permitir sequenciar um grande número de genes de forma rápida e económica.

O presente estudo permitiu esclarecer a etiologia molecular de 39% dos doentes com DR. Possibilitou ainda alargar o espectro mutacional associado a estas doenças pela identificação de duas novas variantes nunca antes associadas a doença. São estudos como este que demonstram o grau de complexidade inerente à análise bioinformática do mendelioma e a necessidade contínua da expansão do nosso conhecimento sobre os genes e o seu impacto fisiológico, de modo a facilitar a associação de novas variantes às doenças genéticas.

Relativamente aos doentes sem causa molecular identificada, técnicas adicionais podem ser implementadas para detetar variantes genéticas não identificadas por NGS, nomeadamente as variações do número de cópias. Esta situação verifica-se em dois dos doentes analisados, na qual a abordagem por NGS apenas permitiu identificar um dos possíveis alelos causais e só com o estudo do cDNA é que se confirmou a suspeita inicial. Por ser analisado um número massivo de genes, a análise conjunta por NGS e por *microarrays* pode assim contribuir para o aumento da percentagem dos casos positivos. Outra alternativa seria prosseguir o estudo molecular por WES ou WGS, dado a sua capacidade de identificar novas variantes genéticas, especialmente quando estas estão ligadas a fenótipos não tradicionais.

Futuramente, todos os resultados obtidos devem ser confirmados através do estudo de segregação dos progenitores. Além disso, poderão ser realizados a análise de preditores de estrutura tridimensional ou então estudos funcionais para determinar o papel das duas novas variantes aqui descritas na expressão e na função da proteína. Seria também interessante analisar novamente, após alguns anos, os doentes sem causa molecular identificável, utilizando novas ferramentas de análise bioinformática, de modo a verificar se já existem novas associações entre as variantes e doença.

Em suma, este trabalho permitiu esclarecer a etiologia molecular de 39% dos doentes estudados com doenças genéticas raras, pela análise do seu exoma clínico através de abordagens de NGS. Identificaram-se também duas novas variantes, permitindo ampliar o espectro mutacional associado às DR.





## **Capítulo 7**

---

### **Referências bibliográficas**



- Abily-Donval, L., Torre, S., Samson, A., Sudrié-Arnaud, B., Acquaviva, C., Guerrot, A., Benoist, J., Marret, S., Bekri, S., e Tebani, A. (2017). Methylmalonyl-CoA epimerase deficiency mimicking propionic aciduria. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 1–6. <https://doi.org/10.3390/ijms18112294>
- Adzhubei, I., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A., e Sunyaev, S. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods*, 7(4), 248–249. <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>
- Agilent Technologies. (2021). *SureSelectQXT - Enrichment for Illumina Multiplexed Sequencing*.
- Aiuti, A., Roncarolo, M. G., e Naldini, L. (2017). Gene therapy for ADA-SCID, the first marketing approval of an ex vivo gene therapy in Europe: paving the road for the next generation of advanced therapy medicinal products. *EMBO molecular medicine*, 9(6), 737–740. <https://doi.org/10.15252/emmm.201707573>
- Akkouh, I., Ueland, T., Andreassen, O., Brattbakk, H.-R., Steen, V., Hughes, T., e Djurovic, S. (2018). Expression of TCN1 in Blood is Negatively Associated with Verbal Declarative Memory Performance. *Scientific reports*, 8(1), 12654. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30898-5>
- Almannai, M., Alfadhel, M., e El-Hattab, A. (2019). Carnitine Inborn Errors of Metabolism. *Molecules*, 24(18), 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules24183251>
- Alston, C., Rocha, M., Lax, N., Turnbull, D., e Taylor, R. (2017). The genetics and pathology of mitochondrial disease. *The Journal of pathology*, 241(2), 236–250. <https://doi.org/10.1002/path.4809>
- Amorim, A., Fernandes, T., e Taveira, N. (2019). Mitochondrial DNA in human identification: a review. *PeerJ*, 7, e7314. <https://doi.org/10.7717/peerj.7314>
- Anderson, D., Viau, K., Botto, L., Pasquali, M., e Longo, N. (2020). Clinical and biochemical outcomes of patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Molecular genetics and metabolism*, 129(1), 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.11.006>
- Aronson, J. (2006). Rare diseases and orphan drugs. *British journal of clinical pharmacology*, 61(3), 243–245. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2006.02617.x>
- Assiri, Y., Iqbal, M., e Almanie, R. (2018). Glycogen Storage Disease in Pediatric Population. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 70(12), 2067–2071. <https://doi.org/10.12816/0045030>
- Attwood, M., Rask-Andersen, M., e Schiöth, H. (2018). Orphan Drugs and Their Impact on Pharmaceutical Development. *Trends in pharmacological sciences*, 39(6), 525–535. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.03.003>
- Aubourg, P., e Wanders, R. (2013). Peroxisomal disorders. *Handbook of clinical neurology*, 113, 1593–1609. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59565-2.00028-9>
- Austin, C., Cutillo, C., Lau, L., Jonker, A., Rath, A., Julkowska, D., Thomson, D., Terry, S., de Montleau, B., Ardigò, D., Hivert, V., Boycott, K., Baynam, G., Kaufmann, P., Taruscio, D., Lochmüller, H., Suematsu, M., Incerti, C., Draghia-Akli, R., ... Dawkins, H. (2018). Future of Rare Diseases Research 2017-2027: An IRDiRC Perspective. *Clinical and translational science*, 11(1), 21–27. <https://doi.org/10.1111/cts.12500>
- Baertling, F., Alhaddad, B., Seibt, A., Budaeus, S., Meitinger, T., Strom, T., Mayatepek, E., Schaper, J., Prokisch, H., Haack, T., e Distelmaier, F. (2017). Neonatal encephalocardiomyopathy caused by mutations in VARS2. *Metabolic brain disease*, 32(1), 267–270. <https://doi.org/10.1007/s11011-016-9890-2>
- Baertling, F., Mayatepek, E., Thimm, E., Schlune, A., Kovacevic, A., Distelmaier, F., Salomons, G., e Meissner, T. (2014). Malonic aciduria: long-term follow-up of new patients detected by newborn screening. *European journal of pediatrics*, 173(12), 1719–1722. <https://doi.org/10.1007/s00431-014-2421-4>

- Balakrishnan, U. (2021). Inborn Errors of Metabolism-Approach to Diagnosis and Management in Neonates. *Indian Journal of Pediatrics*, 88(7), 679–689. <https://doi.org/10.1007/s12098-021-03759-9>
- Barić, I., Staufner, C., Augoustides-Savvopoulou, P., Chien, Y.-H., Dobbelaere, D., Grünert, S., Opladen, T., Petković-Ramadža, D., Rakić, B., Wedell, A., e Blom, H. (2017). Consensus recommendations for the diagnosis, treatment and follow-up of inherited methylation disorders. *Journal of inherited metabolic disease*, 40(1), 5–20. <https://doi.org/10.1007/s10545-016-9972-7>
- Barroso, F., Correia, J., Bandeira, A., Carmona, C., Vilarinho, L., Almeida, M., Rocha, J., e Martins, E. (2020). Tyrosinemia Type III: A Case Report Of Siblings And Literature Review. *Revista paulista de pediatria*, 38, e2018158. <https://doi.org/10.1590/1984-0462/2020/38/2018158>
- Baruteau, J., Diez-Fernandez, C., Lerner, S., Ranucci, G., Gissen, P., Dionisi-Vici, C., Nagamani, S., Erez, A., e Häberle, J. (2019). Argininosuccinic aciduria: Recent pathophysiological insights and therapeutic prospects. *Journal of inherited metabolic disease*, 42(6), 1147–1161. <https://doi.org/10.1002/jimd.12047>
- Batshaw, M., Tuchman, M., Summar, M., e Seminara, J. (2014). A longitudinal study of urea cycle disorders. *Molecular genetics and metabolism*, 113(1–2), 127–130. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2014.08.001>
- Baumgartner, M., Hörster, F., Dionisi-Vici, C., Haliloglu, G., Karall, D., Chapman, K., Huemer, M., Hochuli, M., Assoun, M., Ballhausen, D., Burlina, A., Fowler, B., Grünert, S., Grünewald, S., Honzik, T., Merinero, B., Pérez-Cerdá, C., Scholl-Bürgi, S., Skovby, F., ... Chakrapani, A. (2014). Proposed guidelines for the diagnosis and management of methylmalonic and propionic acidemia. *Orphanet journal of rare diseases*, 9, 130. <https://doi.org/10.1186/s13023-014-0130-8>
- Bellettato, C., Hubert, L., Scarpa, M., e Wangler, M. (2018). Inborn Errors of Metabolism Involving Complex Molecules: Lysosomal and Peroxisomal Storage Diseases. *Pediatric clinics of North America*, 65(2), 353–373. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2017.11.011>
- Bikker, H., Bakker, H. D., Abeling, N. G. G. M., Poll-The, B. T., Kleijer, W. J., Rosenblatt, D. S., Waterham, H. R., Wanders, R. J. A., e Duran, M. (2006). A homozygous nonsense mutation in the methylmalonyl-CoA epimerase gene (MCEE) results in mild methylmalonic aciduria. *Human mutation*, 27(7), 640–643. <https://doi.org/10.1002/humu.20373>
- Blackburn, P., Gass, J., Vairo, F. P., Farnham, K., Atwal, H., Macklin, S., Klee, E., e Atwal, P. (2017). Maple syrup urine disease: mechanisms and management. *The Application of Clinical Genetics*, 10, 57–66. <https://doi.org/10.2147/TACG.S125962>
- Boy, N., Mühlhausen, C., Maier, E., Heringer, J., Assmann, B., Burgard, P., Dixon, M., Fleissner, S., Greenberg, C., Harting, I., Hoffmann, G., Karall, D., Koeller, D., Krawinkel, M., Okun, J., Opladen, T., Posset, R., Sahm, K., Zschocke, J., e Kölker, S. (2017). Proposed recommendations for diagnosing and managing individuals with glutaric aciduria type I: second revision. *Journal of inherited metabolic disease*, 40(1), 75–101. <https://doi.org/10.1007/s10545-016-9999-9>
- Boycott, K., e Ardigò, D. (2018). Addressing challenges in the diagnosis and treatment of rare genetic diseases. *Nature reviews. Drug discovery*, 17(3), 151–152. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.246>
- Brandvain, Y., e Wade, M. (2009). The functional transfer of genes from the mitochondria to the nucleus: the effects of selection, mutation, population size and rate of self-fertilization. *Genetics*, 182(4), 1129–1139. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.100024>
- Brasil, S., Leal, F., Vega, A., Navarrete, R., Ecay, M., Desviat, L., Riera, C., Padilla, N., de la Cruz, X., Couce, M. L., Martín-Hernández, E., Morais, A., Pedrón, C., Peña-Quintana, L., Rigoldi, M., Specola, N., de Almeida, I., Vives, I., Yahyaoui, R., ... Pérez, B. (2018). Improving the diagnosis of cobalamin and related defects by genomic analysis, plus functional and structural assessment of novel variants. *Orphanet journal of rare diseases*, 13(1), 125. <https://doi.org/10.1186/s13023-018-0862-y>

- Brodsky, R. (2014). Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 124(18), 2804–2811. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-522128>
- Bruni, F., Di Meo, I., Bellacchio, E., Webb, B., McFarland, R., Chrzanowska-Lightowlers, Z., He, L., Skorupa, E., Moroni, I., Ardisson, A., Walczak, A., Tynismaa, H., Isohanni, P., Mandel, H., Prokisch, H., Haack, T., Bonnen, P., Enrico, B., Pronicka, E., ... Diodato, D. (2018). Clinical, biochemical, and genetic features associated with VARS2-related mitochondrial disease. *Human mutation*, 39(4), 563–578. <https://doi.org/10.1002/humu.23398>
- Bublil, E., e Majtan, T. (2020). Classical homocystinuria: From cystathionine beta-synthase deficiency to novel enzyme therapies. *Biochimie*, 173, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.12.007>
- Cachon-Gonzalez, M. B., Zaccariotto, E., e Cox, T. (2018). Genetics and Therapies for GM2 Gangliosidosis. *Current gene therapy*, 18(2), 68–89. <https://doi.org/10.2174/1566523218666180404162622>
- Caldovic, L., Abdikarim, I., Narain, S., Tuchman, M., e Morizono, H. (2015). Genotype-Phenotype Correlations in Ornithine Transcarbamylase Deficiency: A Mutation Update. *Journal of genetics and genomics*, 42(5), 181–194. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2015.04.003>
- Carmel, R., Parker, J., e Kelman, Z. (2009). Genomic mutations associated with mild and severe deficiencies of transcobalamin I (haptocorrin) that cause mildly and severely low serum cobalamin levels. *British journal of haematology*, 147(3), 386–391. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07855.x>
- Cerqua, C., Buson, L., e Trevisson, E. (2021). Mutations in Assembly Factors Required for the Biogenesis of Mitochondrial Respiratory Chain. Em P. Navas e L. Salviati (Eds.), *Mitochondrial Diseases: Theory, Diagnosis and Therapy* (p. 305). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-70147-5>
- Chan, D. (2020). Mitochondrial Dynamics and Its Involvement in Disease. *Annual review of pathology*, 15, 235–259. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032711>
- Chang, I., He, M., e Lam, C. (2018). Congenital disorders of glycosylation. *Annals of translational medicine*, 6(24), 477. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.10.45>
- Chen, F., McLenachan, S., Edel, M., Da Cruz, L., Coffey, P., e Mackey, D. (2014). iPS Cells for Modelling and Treatment of Retinal Diseases. *Journal of clinical medicine*, 3(4), 1511–1541. <https://doi.org/10.3390/jcm3041511>
- Chen, T., He, J., Huang, Y., e Zhao, W. (2011). The generation of mitochondrial DNA large-scale deletions in human cells. *Journal of human genetics*, 56(10), 689–694. <https://doi.org/10.1038/jhg.2011.97>
- Chinsky, J., Singh, R., Ficicioglu, C., van Karnebeek, C., Grompe, M., Mitchell, G., Waisbren, S., Guçsavas-Calikoglu, M., Wasserstein, M., Coakley, K., e Scott, R. (2017). Diagnosis and treatment of tyrosinemia type I: a US and Canadian consensus group review and recommendations. *Genetics in medicine*, 19(12), 1–16. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.101>
- Cornel, M., Rigter, T., Jansen, M., e Henneman, L. (2021). Neonatal and carrier screening for rare diseases: how innovation challenges screening criteria worldwide. *Journal of community genetics*, 12(2), 257–265. <https://doi.org/10.1007/s12687-020-00488-y>
- Cornelius, L., Raju, V., e Julin, A. (2020). Hyperargininemia Presenting as Intermittent Ataxia and Cerebellar Atrophy. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 23(3), 380–381. [https://doi.org/10.4103/aian.AIAN\\_130\\_19](https://doi.org/10.4103/aian.AIAN_130_19)
- Coromina, J., Vergés, A., e Puig, R. (2015). Déficit congénito de lactasa: identificación de una nueva mutación. *Anales de pediatria*, 82(5), 365–366. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2014.10.017>
- Cox, S. (2013). Energy Metabolism. *Encyclopedia of Human Nutrition*, 3, 177–185. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00091-X>

- Craven, L., Alston, C., Taylor, R., e Turnbull, D. (2017). Recent Advances in Mitochondrial Disease. *Annual review of genomics and human genetics*, 18, 257–275. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091416-035426>
- Dard, L., Blanchard, W., Hubert, C., Lacombe, D., e Rossignol, R. (2020). Mitochondrial functions and rare diseases. *Molecular aspects of medicine*, 71, 100842. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.100842>
- De Castro, M., Johnston, J., e Biesecker, L. (2015). Determining the prevalence of McArdle disease from gene frequency by analysis of next-generation sequencing data. *Genetics in Medicine*, 17(12), 1002–1006. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.9>
- Delgado, M., Martinez-Domenech, G., Sarrión, P., Urreiziti, R., Zecchini, L., Robledo, H., Segura, F., de Kremer, D., Balcells, S., Grinberg, D., e Asteggiano, C. (2014). A broad spectrum of genomic changes in latinamerican patients with EXT1/EXT2-CDG. *Scientific reports*, 4, 6407. <https://doi.org/10.1038/srep06407>
- Derayeh, S., Kazemi, A., Rabiei, R., Hosseini, A., e Moghaddasi, H. (2018). National information system for rare diseases with an approach to data architecture: A systematic review. *Intractable e rare diseases research*, 7(3), 156–163. <https://doi.org/10.5582/irdr.2018.01065>
- Desmet, F.-O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-Bérout, G., Claustres, M., e Bérout, C. (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic acids research*, 37(9), e67. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp215>
- Despacho n.º 2129-B/2015. (2015). Em *Diário da República* (Vol. 41, pp. 8–10).
- Dillon, O. J., Lunke, S., Stark, Z., Yeung, A., Thorne, N., Gaff, C., White, S. M., e Tan, T. Y. (2018). Exome sequencing has higher diagnostic yield compared to simulated disease-specific panels in children with suspected monogenic disorders. *European journal of human genetics*, 26(5), 644–651. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0099-1>
- DiMauro, S., Tanji, K., e Schon, E. (2017). Mitochondrial Encephalomyopathies. *Neuroscience and Biobehavioral Psychology*, 1, 895–901. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.01974-X>
- Diodato, D., Melchionda, L., Haack, T., Dallabona, C., Baruffini, E., Donnini, C., Granata, T., Ragona, F., Balestri, P., Margollicci, M., Lamantea, E., Nasca, A., Powell, C., Minczuk, M., Strom, T., Meitinger, T., Prokisch, H., Lamperti, C., Zeviani, M., e Ghezzi, D. (2014). VARS2 and TARS2 mutations in patients with mitochondrial encephalomyopathies. *Human mutation*, 35(8), 983–989. <https://doi.org/10.1002/humu.22590>
- Direcção-Geral da Saúde. (2008). *Programa Nacional para Doenças Raras*.
- Dunbar, C., High, K., Joung, K., Kohn, D., Ozawa, K., e Sadelain, M. (2018). Gene therapy comes of age. *Science*, 359(6372), eaan4672. <https://doi.org/10.1126/science.aan4672>
- Ebrahimi-Fakhari, D., van Karnebeek, C., e Münchau, A. (2019). Movement Disorders in Treatable Inborn Errors of Metabolism. *Movement disorders*, 34(5), 598–613. <https://doi.org/10.1002/mds.27568>
- Echaniz-Laguna, A., Ghezzi, D., Chassagne, M., Mayençon, M., Padet, S., Melchionda, L., Rouvet, I., Lannes, B., Bozon, D., Latour, P., Zeviani, M., e Mousson de Camaret, B. (2013). SURF1 deficiency causes demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology*, 81(17), 1523–1530. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182a4a518>
- El-Hattab, A. (2015). Inborn errors of metabolism. *Clinics in perinatology*, 42(2), 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2015.02.010>
- Engelen, M., Kemp, S., de Visser, M., van Geel, B., Wanders, R., Aubourg, P., e Poll-The, B. (2012). X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): clinical presentation and guidelines for diagnosis, follow-up and management. *Orphanet journal of rare diseases*, 7, 51. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-51>
- Engels, D., e Zhou, X.-N. (2020). Neglected tropical diseases: an effective global response to local poverty-related disease priorities. *Infectious diseases of poverty*, 9(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s40249-020-0630-9>

- Ezgu, F. (2016). Inborn Errors of Metabolism. *Advances in clinical chemistry*, 73, 195–250. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2015.12.001>
- Falkenberg, M. (2018). Mitochondrial DNA replication in mammalian cells: overview of the pathway. *Essays in biochemistry*, 62(3), 287–296. <https://doi.org/10.1042/EBC20170100>
- Ferdinandusse, S., Denis, S., Mooyer, P., Dekker, C., Duran, M., Soorani-Lusing, R., Boltshauser, E., Macaya, A., Gärtner, J., Majoie, C., Barth, P., Wanders, R., e Poll-The, B. (2006). Clinical and biochemical spectrum of D-bifunctional protein deficiency. *Annals of neurology*, 59(1), 92–104. <https://doi.org/10.1002/ana.20702>
- Ferreira, C. (2019). The burden of rare diseases. *American journal of medical genetics. Part A*, 179(6), 885–892. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61124>
- Ferreira, C., e Gahl, W. (2017). Lysosomal storage diseases. *Translational Science of Rare Diseases*, 2(1–2), 1–71. <https://doi.org/10.3233/TRD-160005>
- Ferreira, C., Rahman, S., Keller, M., e Zschocke, J. (2021). An international classification of inherited metabolic disorders (ICIMD). *Journal of inherited metabolic disease*, 44(1), 164–177. <https://doi.org/10.1002/jimd.12348>
- Ferreira, C., e van Karnebeek, C. (2019). Inborn errors of metabolism. *Handbook of clinical neurology*, 162(3), 449–481. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64029-1.00022-9>
- Ferreira, F., Azevedo, L., Sousa, C., Neiva, R., Fonseca, H., Marcão, A., Rocha, H., Carmona, C., Ramos, S., Bandeira, A., Martins, E., Campos, T., Rodrigues, E., Garcia, P., Diogo, L., Ferreira, A. C., Sequeira, S., Silva, F., Rodrigues, L., ... Vilarinho, L. (2020). Fenilcetonúria em Portugal: 40 anos de rastreio neonatal (1979-2019). *Boletim Epidemiológico Observações*, 9(28), 50–57.
- Filograna, R., Mennuni, M., Alsina, D., e Larsson, N.-G. (2021). Mitochondrial DNA copy number in human disease: the more the better? *FEBS letters*, 595(8), 976–1002. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14021>
- Fink, J. K. (2013). Hereditary spastic paraplegia: clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms. *Acta neuropathologica*, 126(3), 307–328. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1115-8>
- Fonseca, D., Amaral, I., Pinto, A. C., e Cotrim, M. D. (2019). Orphan drugs: major development challenges at the clinical stage. *Drug discovery today*, 24(3), 867–872. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.01.005>
- Fontana, G., e Gahlon, H. (2020). Mechanisms of replication and repair in mitochondrial DNA deletion formation. *Nucleic acids research*, 48(20), 11244–11258. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa804>
- Forny, P., e Grunewald, S. (2020). An expanding spectrum of complications in isolated methylmalonic aciduria. *Journal of mother and child*, 24(2), 9–13. <https://doi.org/10.34763/jmotherandchild.20202402si.2014.000003>
- Fraser, H., Geppert, J., Johnson, R., Johnson, S., Connock, M., Clarke, A., Taylor-Phillips, S., e Stinton, C. (2019). Evaluation of earlier versus later dietary management in long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase or mitochondrial trifunctional protein deficiency: a systematic review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 14(1), 258. <https://doi.org/10.1186/s13023-019-1226-y>
- Fraser, J., e Venditti, C. (2016). Methylmalonic and propionic acidemias: clinical management update. *Current opinion in pediatrics*, 28(6), 682–693. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000422>
- Frigeni, M., Balakrishnan, B., Yin, X., Calderon, F., Mao, R., Pasquali, M., e Longo, N. (2017). Functional and molecular studies in primary carnitine deficiency. *Human mutation*, 38(12), 1684–1699. <https://doi.org/10.1002/humu.23315>

- Gardeitchik, T., Wyckmans, J., e Morava, E. (2018). Complex Phenotypes in Inborn Errors of Metabolism: Overlapping Presentations in Congenital Disorders of Glycosylation and Mitochondrial Disorders. *Pediatric clinics of North America*, 65(2), 375–388. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2017.11.012>
- Geraedts, J. (2017). Healthy children without fear: Reproductive options for patients or couples carrying inherited diseases. *EMBO reports*, 18(5), 666–669. <https://doi.org/10.15252/embr.201744253>
- Gerards, M., Sallevelt, S., e Smeets, H. (2016). Leigh syndrome: Resolving the clinical and genetic heterogeneity paves the way for treatment options. *Molecular genetics and metabolism*, 117(3), 300–312. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2015.12.004>
- Ghaffar, T., Ng, B., Elsayed, S., El Naghi, S., Helmy, S., Mohammed, N., El Hennawy, A., e Freeze, H. (2020). MPI-CDG from a hepatic perspective: Report of two Egyptian cases and review of literature. *JIMD reports*, 56(1), 20–26. <https://doi.org/10.1002/jmd2.12159>
- González-Ortiz, C., Leguizamón, S., e Contreras-García, G. (2017). Peroxisomal disorder, rhizomelyc chondrodysplasia punctata type 1: case report. *Revista chilena de pediatría*, 88(4), 511–516. <https://doi.org/10.4067/S0370-41062017000400011>
- Gorman, G., Chinnery, P., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., Suomalainen, A., Thorburn, D., Zeviani, M., e Turnbull, D. (2016). Mitochondrial diseases. *Nature reviews. Disease primers*, 2, 16080. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.80>
- Gorman, G., Schaefer, A., Ng, Y., Gomez, N., Blakely, E., Alston, C., Feeney, C., Horvath, R., Yu-Wai-Man, P., Chinnery, P., Taylor, R., Turnbull, D., e McFarland, R. (2015). Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Annals of neurology*, 77(5), 753–759. <https://doi.org/10.1002/ana.24362>
- Grarup, N., Sulem, P., Sandholt, C., Thorleifsson, G., Ahluwalia, T., Steinthorsdottir, V., Bjarnason, H., Gudbjartsson, D., Magnusson, O., Sparsø, T., Albrechtsen, A., Kong, A., Masson, G., Tian, G., Cao, H., Nie, C., Kristiansen, K., Husemoen, L. L., Thuesen, B., ... Pedersen, O. (2013). Genetic architecture of vitamin B12 and folate levels uncovered applying deeply sequenced large datasets. *PLoS genetics*, 9(6), e1003530. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003530>
- Grünert, S., Stucki, M., Morscher, R., Suormala, T., Bürer, C., Burda, P., Christensen, E., Ficicioglu, C., Herwig, J., Kölker, S., Möslinger, D., Pasquini, E., Santer, R., Schwab, O., Wilcken, B., Fowler, B., Yue, W., e Baumgartner, M. (2012). 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: clinical, biochemical, enzymatic and molecular studies in 88 individuals. *Orphanet journal of rare diseases*, 7, 31. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-31>
- Guerrero, R. B., Salazar, D., e Tanpaiboon, P. (2018). Laboratory diagnostic approaches in metabolic disorders. *Annals of translational medicine*, 6(24), 470. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.11.05>
- Gytz, H., Liang, J., Liang, Y., Gorelik, A., Illes, K., e Nagar, B. (2019). The structure of mammalian  $\beta$ -mannosidase provides insight into  $\beta$ -mannosidosis and nystagmus. *The FEBS journal*, 286(7), 1319–1331. <https://doi.org/10.1111/febs.14731>
- Haendel, M., Vasilevsky, N., Unni, D., Bologa, C., Harris, N., Rehm, H., Hamosh, A., Baynam, G., Groza, T., McMurry, J., Dawkins, H., Rath, A., Thaxton, C., Bocci, G., Joachimiak, M., Köhler, S., Robinson, P., Mungall, C., e Oprea, T. (2020). How many rare diseases are there? *Nature reviews. Drug discovery*, 19(2), 77–78. <https://doi.org/10.1038/d41573-019-00180-y>
- Heimer, G., Kerätär, J., Riley, L., Balasubramaniam, S., Eyal, E., Pietikäinen, L., Hiltunen, J., Marek-Yagel, D., Hamada, J., Gregory, A., Rogers, C., Hogarth, P., Nance, M., Shalva, N., Veber, A., Tzadok, M., Nissenkorn, A., Tonduti, D., Renaldo, F., ... Hayflick, S. (2016). MECR Mutations Cause Childhood-Onset Dystonia and Optic Atrophy, a Mitochondrial Fatty Acid Synthesis Disorder. *American Journal of Human Genetics*, 99(6), 1229–1244. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.09.021>



- Hendrickx, K., e Dooms, M. (2021). Orphan Drugs, Compounded Medication and Pharmaceutical Commons. *Frontiers in pharmacology*, 12, 738458. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.738458>
- Henriques, B., Lucas, T., Martins, E., Gaspar, A., Bandeira, A., Nogueira, C., Brandão, O., Rocha, H., Vilarinho, L., e Gomes, C. (2019). Molecular and Clinical Investigations on Portuguese Patients with Multiple acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency. *Current molecular medicine*, 19(7), 487–493. <https://doi.org/10.2174/1566524019666190507114748>
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., e Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human immunology*, 82(11), 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
- Huemer, M., Diodato, D., Schwahn, B., Schiff, M., Bandeira, A., Benoist, J.-F., Burlina, A., Cerone, R., Couce, M., Garcia-Cazorla, A., la Marca, G., Pasquini, E., Vilarinho, L., Weisfeld-Adams, J., Kožich, V., Blom, H., Baumgartner, M., e Dionisi-Vici, C. (2017). Guidelines for diagnosis and management of the cobalamin-related remethylation disorders cblC, cblD, cblE, cblF, cblG, cblJ and MTHFR deficiency. *Journal of inherited metabolic disease*, 40(1), 21–48. <https://doi.org/10.1007/s10545-016-9991-4>
- INSA. (2020). *Programa Nacional de Rastreio Neonatal*. Disponível em <https://www.insa.min-saude.pt/category/areas-de-atuacao/genetica-humana/programa-nacional-de-diagnostico-precoce/> (acedido a 10 de março de 2022)
- Jackson, M., Marks, L., May, G., e Wilson, J. (2018). The genetic basis of disease. *Essays in biochemistry*, 62(5), 643–723. <https://doi.org/10.1042/EBC20170053>
- Jaeken, J. (2013). Congenital disorders of glycosylation. *Handbook of Clinical Neurology*, 113(3), 1737–1743.
- Järvelä, I., Torniaainen, S., e Kolho, K.-L. (2009). Molecular genetics of human lactase deficiencies. *Annals of medicine*, 41(8), 568–575. <https://doi.org/10.1080/07853890903121033>
- Ji, J., Leung, M., Baker, S., Deignan, J., e Santani, A. (2021). Clinical Exome Reanalysis: Current Practice and Beyond. *Molecular diagnosis e therapy*, 25(5), 529–536. <https://doi.org/10.1007/s40291-021-00541-7>
- Jones, D., Perez, L., e Ryan, R. (2020). 3-Methylglutaric acid in energy metabolism. *Clinica chimica acta: international journal of clinical chemistry*, 502, 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.11.006>
- Judge, A., e Dodd, M. (2020). Metabolism. *Essays in biochemistry*, 64(4), 607–647. <https://doi.org/10.1042/EBC20190041>
- Kanungo, S., Wells, K., Tribett, T., e El-Gharbawy, A. (2018). Glycogen metabolism and glycogen storage disorders. *Annals of translational medicine*, 6(24), 474. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.10.59>
- Kawuki, J., Musa, T., Obore, N., e Papabathini, S. (2019). Sick Cell Disease in East African Countries: Prevalence, Complications and Management. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, 30(8), 1–9. <https://doi.org/10.9734/jammr/2019/v30i830220>
- Kenneson, A., e Singh, R. H. (2020). Presentation and management of N-acetylglutamate synthase deficiency: a review of the literature. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 15(1), 279. <https://doi.org/10.1186/s13023-020-01560-z>
- Keskinen, P., Siitonen, A., e Salo, M. (2008). Hereditary urea cycle diseases in Finland. *Acta paediatrica*, 97(10), 1412–1419. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2008.00923.x>
- Khan, S., e Tomatsu, S. (2020). Mucopolidoses Overview: Past, Present, and Future. *International journal of molecular sciences*, 21(18), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms21186812>
- Kilimann, M., e Oldfors, A. (2015). Glycogen pathways in disease: new developments in a classical field of medical genetics. *Journal of inherited metabolic disease*, 38(3), 483–487. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9785-5>

- Kircher, M., Witten, D., Jain, P., O’Roak, B., Cooper, G., e Shendure, J. (2014). A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nature genetics*, 46(3), 310–315. <https://doi.org/10.1038/ng.2892>
- Kishnani, P., Austin, S., Abdenur, J., Arn, P., Bali, D., Boney, A., Chung, W., Dagli, A. I., Dale, D., Koeberl, D., Somers, M., Wechsler, S., Weinstein, D., Wolfsdorf, J., e Watson, M. (2014). Diagnosis and management of glycogen storage disease type I: a practice guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genetics in medicine*, 16(11), e1. <https://doi.org/10.1038/gim.2014.128>
- Klouwer, F., Berendse, K., Ferdinandusse, S., Wanders, R., Engelen, M., e Poll-The, B. (2015). Zellweger spectrum disorders: clinical overview and management approach. *Orphanet journal of rare diseases*, 10, 151. <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0368-9>
- Kohler, L., Puertollano, R., e Raben, N. (2018). Pompe Disease: From Basic Science to Therapy. *Neurotherapeutics*, 15(4), 928–942. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-0655-y>
- Kruszka, P., e Regier, D. (2019). Inborn Errors of Metabolism: From Preconception to Adulthood. *American family physician*, 99(1), 25–32.
- Kušíková, K., Feichtinger, R. G., Csillag, B., Kalev, O. K., Weis, S., Duba, H.-C., Mayr, J. A., e Weis, D. (2021). Case Report and Review of the Literature: A New and a Recurrent Variant in the VARS2 Gene Are Associated With Isolated Lethal Hypertrophic Cardiomyopathy, Hyperlactatemia, and Pulmonary Hypertension in Early Infancy. *Frontiers in pediatrics*, 9, 660076. <https://doi.org/10.3389/fped.2021.660076>
- Kwon, J. (2018). Testing for Inborn Errors of Metabolism. *Continuum*, 24(1, Child Neurology), 37–56. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000563>
- Kwon, J., Matern, D., Kurtzberg, J., Wrabetz, L., Gelb, M., Wenger, D., Ficicioglu, C., Waldman, A., Burton, B., Hopkins, P., e Orsini, J. (2018). Consensus guidelines for newborn screening, diagnosis and treatment of infantile Krabbe disease. *Orphanet journal of rare diseases*, 13(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s13023-018-0766-x>
- Lake, N., Compton, A., Rahman, S., e Thorburn, D. (2016). Leigh syndrome: One disorder, more than 75 monogenic causes. *Annals of neurology*, 79(2), 190–203. <https://doi.org/10.1002/ana.24551>
- Lappalainen, T., Scott, A. J., Brandt, M., e Hall, I. M. (2019). Genomic Analysis in the Age of Human Genome Sequencing. *Cell*, 177(1), 70–84. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.032>
- Lee, I.-C., e Chiang, K.-L. (2021). Clinical Diagnosis and Treatment of Leigh Syndrome Based on SURF1: Genotype and Phenotype. *Antioxidants*, 10(12), 1–14. <https://doi.org/10.3390/antiox10121950>
- Legati, A., Reyes, A., Nasca, A., Invernizzi, F., Lamantea, E., Tiranti, V., Garavaglia, B., Lamperti, C., Ardisson, A., Moroni, I., Robinson, A., Ghezzi, D., e Zeviani, M. (2016). New genes and pathomechanisms in mitochondrial disorders unraveled by NGS technologies. *Biochimica et biophysica acta*, 1857(8), 1326–1335. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.02.022>
- Li, A., e Schnaar, R. (2018). Congenital Disorders of Ganglioside Biosynthesis. *Progress in molecular biology and translational science*, 156, 63–82. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.01.001>
- Liu, Z., Shimura, M., Zhang, L., Zhang, W., Wang, J. J., Ogawa-Tominaga, M., Wang, J. J., Wang, X., Lv, J., Shi, W., Zhang, V., Murayama, K., e Fang, F. (2021). Whole exome sequencing identifies a novel homozygous MEER mutation in a Chinese patient with childhood-onset dystonia and basal ganglia abnormalities, without optic atrophy. *Mitochondrion*, 57, 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.12.014>
- Locatelli, F., Puzenat, E., Arnoux, J., Blanc, D., e Aubin, F. (2017). Richner-Hanhart syndrome (tyrosinemia type II). *Cutis*, 100(6), e20–e22.

- Lochmüller, H., Farnell, J., Le Cam, Y., Jonker, A., Lau, L., Baynam, G., Kaufmann, P., Dawkins, H., Lasko, P., Austin, C., e Boycott, K. (2017). The International Rare Diseases Research Consortium: Policies and Guidelines to maximize impact. *European journal of human genetics*, 25(12), 1293–1302. <https://doi.org/10.1038/s41431-017-0008-z>
- Marcão, A., Rocha, H., Sousa, C., Fonseca, H., Carvalho, I., Lopes, L., e Vilarinho, L. (2017). Rastreio neonatal em Portugal: resultados de 1979 a 2016. *Boletim Epidemiológico Observações*, 6(20), 7–12.
- Martikainen, M., Burn, D., e Turnbull, D. (2016). Spectrum of Movement Disorders in Mitochondrial Disorders-Reply. *JAMA neurology*, 73(10), 1254–1255. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.2578>
- Martinelli, D., Diodato, D., Ponzi, E., Monné, M., Boenzi, S., Bertini, E., Fiermonte, G., e Dionisi-Vici, C. (2015). The hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria syndrome. *Orphanet journal of rare diseases*, 10, 29. <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0242-9>
- Martínez, A. I., Pérez-Arellano, I., Pekkala, S., Barcelona, B., e Cervera, J. (2010). Genetic, structural and biochemical basis of carbamoyl phosphate synthetase 1 deficiency. *Molecular genetics and metabolism*, 101(4), 311–323. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.08.002>
- Martins, E., Cardoso, M. L., Rodrigues, E., Barbot, C., Ramos, A., Bennett, M., Teles, E., e Vilarinho, L. (2011). Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: the clinical relevance of an early diagnosis and report of four new cases. *Journal of inherited metabolic disease*, 34(3), 835–842. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9287-7>
- Matsumoto, S., Häberle, J., Kido, J., Mitsubuchi, H., Endo, F., e Nakamura, K. (2019). Urea cycle disorders-update. *Journal of human genetics*, 64(9), 833–847. <https://doi.org/10.1038/s10038-019-0614-4>
- Ministère des Solidarités et de la Santé. (2018). *French National Plan for Rare Diseases 2018-2022*.
- Mizuguchi, T., Nakashima, M., Kato, M., Yamada, K., Okanishi, T., Ekhilevitch, N., Mandel, H., Eran, A., Toyono, M., Sawaishi, Y., Motoi, H., Shiina, M., Ogata, K., Miyatake, S., Miyake, N., Saitsu, H., e Matsumoto, N. (2017). PARS2 and NARS2 mutations in infantile-onset neurodegenerative disorder. *Journal of human genetics*, 62(5), 525–529. <https://doi.org/10.1038/jhg.2016.163>
- Moggio, M., Colombo, I., Peverelli, L., Villa, L., Xhani, R., Testolin, S., DiMauro, S., e Sciacco, M. (2014). Mitochondrial disease heterogeneity: a prognostic challenge. *Acta myologica: myopathies and cardiomyopathies*, 33(2), 86–93. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091416-035426>
- Molares-Vila, A., Corbalán-Rivas, A., Carnero-Gregorio, M., González-Cespón, J. L., e Rodríguez-Cerdeira, C. (2021). Biomarkers in Glycogen Storage Diseases: An Update. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 1–31. <https://doi.org/10.3390/ijms22094381>
- Molnar, M. J., e Kovacs, G. (2017). Mitochondrial diseases. *Handbook of clinical neurology*, 145, 147–155. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00010-9>
- Monin, M.-L., Mignot, C., De Lonlay, P., Héron, B., Masurel, A., Mathieu-Dramard, M., Lenaerts, C., Thauvin, C., Gérard, M., Roze, E., Jacqueline, A., Charles, P., de Baracé, C., e Drouin-Garraud (2014). 29 French adult patients with PMM2-congenital disorder of glycosylation: outcome of the classical pediatric phenotype and depiction of a late-onset phenotype. *Orphanet journal of rare diseases*, 9, 207. <https://doi.org/10.1186/s13023-014-0207-4>
- Morais, S., Raymond, L., Mairey, M., Coutinho, P., Brandão, E., Ribeiro, P., Loureiro, J., Sequeiros, J., Brice, A., Alonso, I., e Stevanin, G. (2017). Massive sequencing of 70 genes reveals a myriad of missing genes or mechanisms to be uncovered in hereditary spastic paraplegias. *European journal of human genetics*, 25(11), 1217–1228. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2017.124>

- Morava, E., Tiemes, V., Thiel, C., Seta, N., de Lonlay, P., de Klerk, H., Mulder, M., Rubio-Gozalbo, E., Visser, G., van Hasselt, P., Horovitz, D., de Souza, C., Schwartz, I., Green, A., Al-Owain, M., Uziel, G., Sigaudy, S., Chabrol, B., van Spronsen, F.-J., ... Wevers, R. (2016). ALG6-CDG: a recognizable phenotype with epilepsy, proximal muscle weakness, ataxia and behavioral and limb anomalies. *Journal of inherited metabolic disease*, 39(5), 713–723. <https://doi.org/10.1007/s10545-016-9945-x>
- Morlino, S., Nardella, G., Castellana, S., Micale, L., Copetti, M., Fusco, C., e Castori, M. (2021). Review of clinical and molecular variability in autosomal recessive cutis laxa 2A. *American journal of medical genetics*, 185(3), 955–965. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.62047>
- Naldini, L. (2015). Gene therapy returns to centre stage. *Nature*, 526(7573), 351–360. <https://doi.org/10.1038/nature15818>
- Ng, P., e Henikoff, S. (2003). SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic acids research*, 31(13), 3812–3814. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg509>
- Ng, Y., e Turnbull, D. (2016). Mitochondrial disease: genetics and management. *Journal of neurology*, 263(1), 179–191. <https://doi.org/10.1007/s00415-015-7884-3>
- Nissanka, N., e Moraes, C. (2020). Mitochondrial DNA heteroplasmy in disease and targeted nuclease-based therapeutic approaches. *EMBO Reports*, 21(3), e49612. <https://doi.org/10.15252/embr.201949612>
- Nogueira, C., Silva, L., Pereira, C., Lopes, A., Encarnação, M., Coutinho, M. F., Amaral, O., Alves, S., e Vilarinho, L. (2019a). DESVENDAR “ DEScobrir , VENcer as Doenças rARas ”. *Boletim Epidemiológico Observações*, 11(15), 73–76.
- Nogueira, C., Silva, L., Pereira, C., Vieira, L., Teles, E. L., Campos, T., Janeiro, P., Gaspar, A., Dupont, J., Bandeira, A., Rodrigues, E., Martins, E., Magalhães, M., Sequeira, S., Vieira, J. P., Santos, H., Vilarinho, S., e Vilarinho, L. (2019b). Targeted next generation sequencing identifies novel pathogenic variants and provides molecular diagnoses in a cohort of pediatric and adult patients with unexplained mitochondrial dysfunction. *Mitochondrion*, 47, 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2019.02.006>
- Nongmaithem, S., Joglekar, C., Krishnaveni, G., Sahariah, S., Ahmad, M., Ramachandran, S., Gandhi, M., Chopra, H., Pandit, A., Potdar, R., Fall, C., Yajnik, C., e Chandak, G. (2017). GWAS identifies population-specific new regulatory variants in FUT6 associated with plasma B12 concentrations in Indians. *Human molecular genetics*, 26(13), 2551–2564. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx071>
- Oliveira, S. (2020). Talking About Rare Diseases: A Compendium on Rare Diseases and Online News. Em L. Costa e S. Oliveira (Eds.), *Communicating Rare Diseases and Disorders in the Digital Age* (1ª edição, pp. 1–86). IGI Global. <https://doi.org/10.4018/978-1-7998-2088-8>
- Ondruskova, N., Cechova, A., Hansikova, H., Honzik, T., e Jaeken, J. (2021). Congenital disorders of glycosylation: Still «hot» in 2020. *Biochimica et biophysica acta*, 1865(1), 129751. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129751>
- Orphanet. (2017). *About orphan drugs*. Disponível em [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Education\\_AboutOrphanDrugs.php?lng=EN](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Education_AboutOrphanDrugs.php?lng=EN) (acedido a 14 de março de 2022)
- Orphanet Report Series. (2022). *Prevalence and incidence of rare diseases: Bibliographic data* (Número 2).
- Orsucci, D., Caldarazzo Ienco, E., Rossi, A., Siciliano, G., e Mancuso, M. (2021). Mitochondrial Syndromes Revisited. *Journal of clinical medicine*, 10(6), 1–18. <https://doi.org/10.3390/jcm10061249>
- Ortiz, A., Germain, D., Desnick, R., Politei, J., Mauer, M., Burlina, A., Eng, C., Hopkin, R., Laney, D., Linhart, A., Waldek, S., Wallace, E., Weidemann, F., e Wilcox, W. (2018). Fabry disease revisited: Management and treatment recommendations for adult patients. *Molecular genetics and metabolism*, 123(4), 416–427. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.02.014>

- Ozben, T. (2013). Expanded newborn screening and confirmatory follow-up testing for inborn errors of metabolism detected by tandem mass spectrometry. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 51(1), 157–176. <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0472>
- Paciotti, S., Codini, M., Tasegian, A., Ceccarini, M. R., Cataldi, S., Arcuri, C., Fioretti, B., Albi, E., e Beccari, T. (2017). Lysosomal alpha-mannosidase and alpha-mannosidosis. *Frontiers in bioscience*, 22(1), 157–167. <https://doi.org/10.2741/4478>
- Paneque, M., Guimarães, L., Nunes, R., Machado, V., Leandro, B., Rodrigues, F., e Sequeiros, J. (2019). Aconselhamento Genético em Doenças Raras. Em F. B. Marques e J. Marques (Eds.), *Livro Branco das doenças raras e dos medicamentos órfãos em Portugal* (pp. 58–77). P-Bio - Associação Portuguesa de Bioindústrias.
- Papadimitriou, S., Gazzo, A., Versbraegen, N., Nachtegael, C., Aerts, J., Moreau, Y., van Dooren, S., Nowé, A., Smits, G., e Lenaerts, T. (2019). Predicting disease-causing variant combinations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(24), 11878–11887. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815601116>
- Parenti, G., Medina, D., e Ballabio, A. (2021). The rapidly evolving view of lysosomal storage diseases. *EMBO molecular medicine*, 13(2), e12836. <https://doi.org/10.15252/emmm.202012836>
- Pavlu-Pereira, H., Silva, M. J., Florindo, C., Sequeira, S., Ferreira, A. C., Duarte, S., Rodrigues, A. L., Janeiro, P., Oliveira, A., Gomes, D., Bandeira, A., Martins, E., Gomes, R., Soares, S., De Almeida, I., Vicente, J., e Rivera, I. (2020). Pyruvate dehydrogenase complex deficiency: updating the clinical, metabolic and mutational landscapes in a cohort of Portuguese patients. *Orphanet journal of rare diseases*, 15(1), 298. <https://doi.org/10.1186/s13023-020-01586-3>
- Péanne, R., de Lonlay, P., Foulquier, F., Kornak, U., Lefeber, D., Morava, E., Pérez, B., Seta, N., Thiel, C., van Schaftingen, E., Matthijs, G., e Jaeken, J. (2018). Congenital disorders of glycosylation (CDG): Quo vadis? *European journal of medical genetics*, 61(11), 643–663. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.10.012>
- Pereira, S., Adrião, M., Sampaio, M., Basto, M., Rodrigues, E., Vilarinho, L., Teles, E., Alonso, I., e Leão, M. (2018). Mitochondrial Encephalopathy: First Portuguese Report of a VARS2 Causative Variant. *JIMD reports*, 42, 113–119. [https://doi.org/10.1007/8904\\_2018\\_89](https://doi.org/10.1007/8904_2018_89)
- Pertea, M., Lin, X., e Salzberg, S. L. (2001). GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction. *Nucleic acids research*, 29(5), 1185–1190. <https://doi.org/10.1093/nar/29.5.1185>
- Petersen, B.-S., Fredrich, B., Hoepfner, M. P., Ellinghaus, D., e Franke, A. (2017). Opportunities and challenges of whole-genome and -exome sequencing. *BMC genetics*, 18(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0479-5>
- Phillips, A., Millet, A., Tigano, M., Dubois, S., Crimmins, H., Babin, L., Charpentier, M., Piganeau, M., Brunet, E., e Sfeir, A. (2017). Single-Molecule Analysis of mtDNA Replication Uncovers the Basis of the Common Deletion. *Molecular cell*, 65(3), 527–538.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.12.014>
- Pina-Neto, J. (2008). Aconselhamento Genético. *Jornal de Pediatria do Rio de Janeiro*, 84(4), S20–S26. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0021-75572008000500004>
- Pinheiro, F., Sperb-Ludwig, F., e Schwartz, I. (2021). Epidemiological aspects of hereditary fructose intolerance: A database study. *Human mutation*, 42(12), 1548–1566. <https://doi.org/10.1002/humu.24282>
- Platt, F., D'Azzo, A., Davidson, B., Neufeld, E., e Tiffit, C. (2018). Lysosomal storage diseases. *Nature reviews. Disease primers*, 4(1), 27. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0025-4>
- Pogue, R., Cavalcanti, D., Shanker, S., Andrade, R., Aguiar, L., de Carvalho, J., e Costa, F. (2018). Rare genetic diseases: update on diagnosis, treatment and online resources. *Drug discovery today*, 23(1), 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.11.002>

- Quevillon, S., Robinson, J., Berthonneau, E., Siatecka, M., e Mirande, M. (1999). Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: identification of protein-protein interactions and characterization of a core protein. *Journal of molecular biology*, 285(1), 183–195. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2316>
- Rahman, S. (2020). Mitochondrial disease in children. *Journal of internal medicine*, 287(6), 609–633. <https://doi.org/10.1111/joim.13054>
- Rajendran, V., Kalita, P., Shukla, H., Kumar, A., e Tripathi, T. (2018). Aminoacyl-tRNA synthetases: Structure, function, and drug discovery. *International journal of biological macromolecules*, 111, 400–414. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.157>
- Reddy, N., Calloni, S., Vernon, H., Boltshauser, E., Huisman, T., e Soares, B. (2018). Neuroimaging Findings of Organic Acidemias and Aminoacidopathies. *Radiographics*, 38(3), 912–931. <https://doi.org/10.1148/rg.2018170042>
- Reese, M., Eeckman, F., Kulp, D., e Haussler, D. (1997). Improved splice site detection in Genie. *Journal of computational biology*, 4(3), 311–323. <https://doi.org/10.1089/cmb.1997.4.311>
- Reva, B., Antipin, Y., e Sander, C. (2011). Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic acids research*, 39(17), e118. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr407>
- Rha, A., Maguire, A., e Martin, D. (2021). GM1 Gangliosidosis: Mechanisms and Management. *The application of clinical genetics*, 14, 209–233. <https://doi.org/10.2147/TACG.S206076>
- Rice, G., e Steiner, R. (2016). Inborn Errors of Metabolism (Metabolic Disorders). *Pediatrics in review*, 37(1), 3–17. <https://doi.org/10.1542/pir.2014-0122>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., e Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine*, 17(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Richter, T., Nestler-Parr, S., Babela, R., Khan, Z., Tesoro, T., Molsen, E., e Hughes, D. (2015). Rare Disease Terminology and Definitions-A Systematic Global Review: Report of the ISPOR Rare Disease Special Interest Group. *Value in Health*, 18(6), 906–914. <https://doi.org/10.1016/j.jval.2015.05.008>
- Rinaldi, C., e Wood, M. (2018). Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders. *Nature reviews. Neurology*, 14(1), 9–21. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.148>
- Robinson, J. C., Kerjan, P., e Mirande, M. (2000). Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: quantitative analysis of protein-protein interactions and mechanism of complex assembly. *Journal of molecular biology*, 304(5), 983–994. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4242>
- Rocha, H., Marcão, A., Sousa, C., Fonseca, H., Lopes, L., Carvalho, I., e Vilarinho, L. (2021). Programa Português de Cribado Neonatal. *Revista española de salud pública*, 95, e1-7.
- Roger, A., Muñoz-Gómez, S., e Kamikawa, R. (2017). The Origin and Diversification of Mitochondria. *Current biology*, 27(21), R1177–R1192. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.015>
- Romain, M., Svirid, S., Linton, D., Stav, I., e van Heerden, P. (2016). The role of Vitamin B12 in the critically ill—a review. *Anaesthesia and intensive care*, 44(4), 447–452. <https://doi.org/10.1177/0310057X1604400410>
- Rosenbloom, B., e Weinreb, N. (2013). Gaucher disease: a comprehensive review. *Critical reviews in oncogenesis*, 18(3), 163–175. <https://doi.org/10.1615/critrevoncog.2013006060>
- Rovelli, V., Manzoni, F., Viau, K., Pasquali, M., e Longo, N. (2019). Clinical and biochemical outcome of patients with very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Molecular genetics and metabolism*, 127(1), 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.04.001>

- Rubinstein, Y., Robinson, P., Gahl, W., Avillach, P., Baynam, G., Cederroth, H., Goodwin, R., Groft, S., Hansson, M., Harris, N., Huser, V., Mascalconi, D., McMurry, J., Might, M., Nellaker, C., Mons, B., Paltoo, D., Pevsner, J., Posada, M., ... Haendel, M. (2020). The case for open science: rare diseases. *JAMA open*, 3(3), 472–486. <https://doi.org/10.1093/jamiaopen/ooaa030>
- Saki, M., e Prakash, A. (2017). DNA damage related crosstalk between the nucleus and mitochondria. *Free radical biology e medicine*, 107, 216–227. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.050>
- Saudubray, J.-M., e Garcia-Cazorla, À. (2018). Inborn Errors of Metabolism Overview: Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management. *Pediatric clinics of North America*, 65(2), 179–208. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2017.11.002>
- Scheper, G., van der Klok, T., van Andel, R., van Berkel, C., Sissler, M., Smet, J., Muravina, T., Serkov, S., Uziel, G., Bugiani, M., Schiffmann, R., Krägeloh-Mann, I., Smeitink, J., Florentz, C., Van Coster, R., Pronk, J., e van der Knaap, M. (2007). Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. *Nature Genetics*, 39(4), 534–539. <https://doi.org/10.1038/ng2013>
- Schlune, A., Riederer, A., Mayatepek, E., e Ensenauer, R. (2018). Aspects of Newborn Screening in Isovaleric Acidemia. *International Journal of Neonatal Screening*, 4(1), 7. <https://doi.org/10.3390/ijns4010007>
- Schubert Baldo, M., e Vilarinho, L. (2020). Molecular basis of Leigh syndrome: a current look. *Orphanet journal of rare diseases*, 15(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s13023-020-1297-9>
- Schuchman, E., e Desnick, R. (2017). Types A and B Niemann-Pick disease. *Molecular genetics and metabolism*, 120(1–2), 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.12.008>
- Schwarz, J., Rödelberger, C., Schuelke, M., e Seelow, D. (2010). MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nature methods*, 7(8), 575–576. <https://doi.org/10.1038/nmeth0810-575>
- Serviço Nacional de Saúde. (2020). *Dia Mundial das Doenças Raras*. Disponível em <https://www.sns.gov.pt/noticias/2020/02/28/dia-mundial-das-doencas-raras-2/> (acedido a 7 de março de 2022)
- Shaimardanova, A., Chulpanova, D., Solovyeva, V., Mullagulova, A., Kitaeva, K., Allegrucci, C., e Rizvanov, A. (2020). Metachromatic Leukodystrophy: Diagnosis, Modeling, and Treatment Approaches. *Frontiers in medicine*, 7, 576221. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.576221>
- Simon, M., Richard, E. M., Wang, X., Shahzad, M., Huang, V. H., Qaiser, T. A., Potluri, P., Mahl, S. E., Davila, A., Nazli, S., Hancock, S., Yu, M., Gargus, J., Chang, R., Al-Sheqaih, N., Newman, W. G., Abdenur, J., Starr, A., e Hegde, R. (2015). Mutations of human NARS2, encoding the mitochondrial asparaginyl-tRNA synthetase, cause nonsyndromic deafness and Leigh syndrome. *PLoS genetics*, 11(3), e1005097. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005097>
- Simon, S., Resch, H., Klaushofer, K., Roschger, P., Zwerina, J., e Kocijan, R. (2018). Hypophosphatasia: From Diagnosis to Treatment. *Current rheumatology reports*, 20(11), 69. <https://doi.org/10.1007/s11926-018-0778-5>
- Sirmaci, A., Edwards, Y., Akay, H., e Tekin, M. (2012). Challenges in whole exome sequencing: an example from hereditary deafness. *PloS one*, 7(2), e32000. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032000>
- Smith, L., Willig, L., e Kingsmore, S. (2015). Whole-Exome Sequencing and Whole-Genome Sequencing in Critically Ill Neonates Suspected to Have Single-Gene Disorders. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(2), 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023168>
- Sofou, K., de Coo, I., Ostergaard, E., Isohanni, P., Naess, K., De Meirleir, L., Tzoulis, C., Uusimaa, J., Lönnqvist, T., Bindoff, L., Tulinius, M., e Darin, N. (2018). Phenotype-genotype correlations in Leigh syndrome: new insights from a multicentre study of 96 patients. *Journal of medical genetics*, 55(1), 21–27. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104891>

- Stellingwerff, M. D., Figuccia, S., Bellacchio, E., Alvarez, K., Castiglioni, C., Topaloglu, P., Stutterd, C. A., Erasmus, C. E., Sanchez-Valle, A., Lebon, S., Hughes, S., Schmitt-Mechelke, T., Vasco, G., Chow, G., Rahikkala, E., Dallabona, C., Okuma, C., Aiello, C., Goffrini, P., ... Van der Knaap, M. S. (2021). LBSL: Case Series and DARS2 Variant Analysis in Early Severe Forms With Unexpected Presentations. *Neurology. Genetics*, 7(2), e559. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000559>
- Stenton, S., e Prokisch, H. (2020). Genetics of mitochondrial diseases: Identifying mutations to help diagnosis. *EBioMedicine*, 56, 102784. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102784>
- Štěrbová, K., Vlčková, M., Hansíková, H., Sebroňová, V., Sedláčková, L., Pavlíček, P., e Laššuthová, P. (2021). Novel variants in the NARS2 gene as a cause of infantile-onset severe epilepsy leading to fatal refractory status epilepticus: case study and literature review. *Neurogenetics*, 22(4), 359–364. <https://doi.org/10.1007/s10048-021-00659-0>
- Stoller, J. (2018). The Challenge of Rare Diseases. *Chest*, 153(6), 1309–1314. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.12.018>
- Suarez-Guerrero, J., Gómez Higuera, P., Flórez, J., e Contreras-García, G. (2016). Mucopolysaccharidosis: clinical features, diagnosis and management. *Revista chilena de pediatría*, 87(4), 295–304. <https://doi.org/10.1016/j.rchipe.2015.10.004>
- Summar, M., Koelker, S., Freedenberg, D., Le Mons, C., Haberle, J., Lee, H.-S., e Kirmse, B. (2013). The incidence of urea cycle disorders. *Molecular genetics and metabolism*, 110(1–2), 179–180. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.07.008>
- Tambuyzer, E., Vandendriessche, B., Austin, C., Brooks, P., Larsson, K., Needleman, K., Valentine, J., Davies, K., Groft, S., Preti, R., Oprea, T., e Prunotto, M. (2020). Therapies for rare diseases: therapeutic modalities, progress and challenges ahead. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 19(2), 93–111. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0049-9>
- Tarailo-Graovac, M., Shyr, C., Ross, C., Horvath, G., Salvarinova, R., Ye, X., Zhang, L.-H., Bhavsar, A., Lee, J., Drögemöller, B., Abdelsayed, M., Alfadhel, M., Armstrong, L., Baumgartner, M., Burda, P., Connolly, M., Cameron, J., Demos, M., Dewan, T., ... van Karnebeek, C. (2016). Exome Sequencing and the Management of Neurometabolic Disorders. *The New England journal of medicine*, 374(23), 2246–2255. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1515792>
- Tiranti, V., Hoertnagel, K., Carrozzo, R., Galimberti, C., Munaro, M., Granatiero, M., Zelante, L., Gasparini, P., Marzella, R., Rocchi, M., Bayona-Bafaluy, M., Enriquez, J., Uziel, G., Bertini, E., Dionisi-Vici, C., Franco, B., Meitinger, T., e Zeviani, M. (1998). Mutations of SURF-1 in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency. *American journal of human genetics*, 63(6), 1609–1621. <https://doi.org/10.1086/302150>
- Tuppen, H., Blakely, E., Turnbull, D., e Taylor, R. (2010). Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797(2), 113–128. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.09.005>
- van Tol, W., Wessels, H., e Lefeber, D. (2019). O-glycosylation disorders pave the road for understanding the complex human O-glycosylation machinery. *Current opinion in structural biology*, 56, 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.12.006>
- van Wegberg, A., MacDonald, A., Ahring, K., Bélanger-Quintana, A., Blau, N., Bosch, A., Burlina, A., Campistol, J., Feillet, F., Gizewska, M., Huijbregts, S., Kearney, S., Leuzzi, V., Maillot, F., Muntau, A., van Rijn, M., Trefz, F., Walter, J., e van Spronsen, F.-J. (2017). The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. *Orphanet journal of rare diseases*, 12(1), 162. <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0685-2>
- Vaz-Drago, R., Custódio, N., e Carmo-Fonseca, M. (2017). Deep intronic mutations and human disease. *Human genetics*, 136(9), 1093–1111. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1809-4>
- Veerappa, S., e McClure, J. (2020). Intermediary metabolism. *Anaesthesia e Intensive Care Medicine*, 21(3), 162–167. <https://doi.org/10.1016/J.MPAIC.2020.01.003>



- Vilarinho, L., Garcia, P., e Costa, P. (2021). *Programa Nacional de Rastreio Neonatal: relatório 2020*. 1–116.
- Wakap, S., Lambert, D., Olry, A., Rodwell, C., Gueydan, C., Lanneau, V., Murphy, D., Le Cam, Y., e Rath, A. (2020). Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *European journal of human genetics*, 28(2), 165–173. <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0508-0>
- Waters, D., Adeloye, D., Woolham, D., Wastnedge, E., Patel, S., e Rudan, I. (2018). Global birth prevalence and mortality from inborn errors of metabolism: a systematic analysis of the evidence. *Journal of global health*, 8(2), 21102. <https://doi.org/10.7189/jogh.08.021102>
- Wedding, I. M., Koht, J., Tran, G. T., Misceo, D., Selmer, K. K., Holmgren, A., Frengen, E., Bindoff, L., Tallaksen, C. M. E., e Tzoulis, C. (2014). Spastic paraplegia type 7 is associated with multiple mitochondrial DNA deletions. *PloS one*, 9(1), e86340. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086340>
- Welling, L., Bernstein, L., Berry, G., Burlina, A., Eyskens, F., Gautschi, M., Grünewald, S., Gubbels, C., Knerr, I., Labrune, P., van der Lee, J., MacDonald, A., Murphy, E., Portnoi, P., Ünay, K., Potter, N., Rubio-Gozalbo, E., Spencer, J., Timmers, I., ... Bosch, A. (2017). International clinical guideline for the management of classical galactosemia: diagnosis, treatment, and follow-up. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 40(2), 171–176. <https://doi.org/10.1007/s10545-016-9990-5>
- Wheeler, S., e Sillence, D. (2020). Niemann-Pick type C disease: cellular pathology and pharmacotherapy. *Journal of neurochemistry*, 153(6), 674–692. <https://doi.org/10.1111/jnc.14895>
- Whyte, M., Greenberg, C., Salman, N., Bober, M., McAlister, W., Wenkert, D., Van Sickle, B., Simmons, J., Edgar, T., Bauer, M., Hamdan, M., Bishop, N., Lutz, R., McGinn, M., Craig, S., Moore, J., Taylor, J., Cleveland, R., Cranley, W., ... Landy, H. (2012). Enzyme-replacement therapy in life-threatening hypophosphatasia. *The New England journal of medicine*, 366(10), 904–913. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1106173>
- World Health Organization. (2013). *Background Paper on Orphan Diseases for the WHO Report on Priority Medicines for Europe and the World*.
- Yamamoto, T., Shimojima, K., Ondo, Y., Imai, K., Chong, P. F., Kira, R., Amemiya, M., Saito, A., e Okamoto, N. (2016). Challenges in detecting genomic copy number aberrations using next-generation sequencing data and the eXome Hidden Markov Model: a clinical exome-first diagnostic approach. *Human genome variation*, 3, 16025. <https://doi.org/10.1038/hgv.2016.25>
- Yan, C., Duanmu, X., Zeng, L., Liu, B., e Song, Z. (2019). Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination. *Cells*, 8(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/cells8040379>
- Yeo, G., e Burge, C. (2004). Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *Journal of computational biology*, 11(2–3), 377–394. <https://doi.org/10.1089/1066527041410418>
- Young, M., e Copeland, W. (2016). Human mitochondrial DNA replication machinery and disease. *Current opinion in genetics e development*, 38, 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.03.005>
- Zhou, X., Cui, Y., e Han, J. (2018). Methylmalonic acidemia: Current status and research priorities. *Intractable e rare diseases research*, 7(2), 73–78. <https://doi.org/10.5582/irdr.2018.01026>
- Zielonka, M., Kölker, S., Gleich, F., Stützenberger, N., Nagamani, S., Gropman, A., Hoffmann, G., Garbade, S., e Posset, R. (2019). Early prediction of phenotypic severity in Citrullinemia Type 1. *Annals of clinical and translational neurology*, 6(9), 1858–1871. <https://doi.org/10.1002/acn3.50886>



---

## **Anexos**



## Anexo 1

### 8.1 Genes incluídos no painel de exoma clínico.

A2M	ABCG2	ACTB	ADGRV1	AGRN	ALDH1A2	AMACR	ANXA5	AQP7	ARV1	ATOH7	ATP7A	BACH2	BFSP1
A2ML1	ABCG5	ACTC1	ADH1A	AGRP	ALDH1A3	AMBN	AOX1	AR	ARVCF	ATP10A	ATP7B	BAG3	BFSP2
A4GALT	ABCG8	ACTG1	ADH1B	AGT	ALDH1B1	AMELX	AP1S1	ARCN1	ARX	ATP10D	ATP8A2	BANF1	BGN
AAAS	ABHD12	ACTG2	ADH1C	AGTR1	ALDH2	AMER1	AP1S2	ARFGFE2	AS3MT	ATP11A	ATP8B1	BANK1	BHLHA9
AAGAB	ABHD5	ACTL6A	ADH4	AGTR2	ALDH3A1	AMH	AP1S3	ARG1	ASAH1	ATP13A2	ATPAF1	BAP1	BHLHE41
AANAT	ABL1	ACTL6B	ADH5	AGXT	ALDH3A2	AMHR2	AP2S1	ARHGAP24	ASB10	ATP13A4	ATPAF2	BARDL1	BICC1
AARS1	ABR	ACTN1	ADH6	AHCY	ALDH3B1	AMMECR1	AP3B1	ARHGAP26	ASB12	ATP1A2	ATR	BARHL1	BICD2
AARS2	ACACA	ACTN2	ADH7	AHDC1	ALDH3B2	AMN	AP3D1	ARHGAP31	ASB4	ATP1A3	ATRIP	BAZ1B	BIN1
AASS	ACAD8	ACTN4	ADHFE1	AHI1	ALDH4A1	AMPD1	AP4B1	ARHGAP36	ASCC1	ATP1B1	ATRX	BBIP1	BIRC3
ABAT	ACAD9	ACVR1	ADI1	AHNAK	ALDH5A1	AMPD2	AP4E1	ARHGAP6	ASCC3	ATP1B4	ATXN1	BBS1	BLK
ABCA1	ACADL	ACVR1B	ADIPOQ	AHNAK2	ALDH6A1	AMPD3	AP4M1	ARHGDI1	ASCL1	ATP2A1	ATXN10	BBS10	BLM
ABCA12	ACADM	ACVR2B	ADIPOR1	AHR	ALDH7A1	AMT	AP4S1	ARHGEF10	ASH1L	ATP2A2	ATXN2	BBS12	BLMH
ABCA3	ACADS	ACVRL1	ADIPOR2	AHSP	ALDH8A1	AMTN	AP5Z1	ARHGEF4	ASIP	ATP2B2	ATXN3	BBS2	BLNK
ABCA4	ACADSB	ACY1	ADK	AICDA	ALDH9A1	ANG	APAF1	ARHGEF6	ASL	ATP2B3	ATXN3L	BBS4	BLOC1S3
ABCA5	ACADVL	ADA	ADM	AIFM1	ALDOA	ANGPT2	APBA2	ARHGEF7	ASMT	ATP2B4	ATXN7	BBS5	BLOC1S5
ABCA7	ACAN	ADA2	ADNP	AIMP1	ALDOB	ANGPTL3	APBB2	ARHGEF9	ASMTL	ATP2C1	AUH	BBS7	BLOC1S6
ABCB1	ACAT1	ADAM10	ADORA2A	AIP	ALG1	ANGPTL4	APC	ARID1A	ASNS	ATP4A	AURKC	BBS9	BLVRA
ABCB10	ACAT2	ADAM17	ADRA2A	AIPL1	ALG10	ANK1	APC2	ARID1B	ASPA	ATP5F1A	AUTS2	BCAM	BMP1
ABCB11	ACBD3	ADAM9	ADRA2B	AIRE	ALG11	ANK2	APCDD1	ARID2	ASPH	ATP5F1B	AVP	BCAN	BMP15
ABCB4	ACBD5	ADAMTS10	ADRA2C	AK1	ALG12	ANK3	APOA1	ARIH1	ASPM	ATP5F1C	AVPR1A	BCAP31	BMP2
ABCB5	ACBD6	ADAMTS13	ADRB1	AK2	ALG13	ANKH	APOA2	ARL11	ASPSCR1	ATP5F1D	AVPR2	BCAT1	BMP4
ABCB6	ACD	ADAMTS17	ADRB2	AKAP10	ALG14	ANKLE2	APOA5	ARL13B	ASS1	ATP5F1E	AWAT2	BCAT2	BMP5
ABCB7	ACE	ADAMTS18	ADRB3	AKAP17A	ALG2	ANKRD1	APOB	ARL14EP	ASXL1	ATP5IF1	AXIN1	BCHE	BMP6
ABCB8	ACE2	ADAMTS2	ADSL	AKAP4	ALG3	ANKRD11	APOC1	ARL2BP	ASXL2	ATP5MC1	AXIN2	BCKDHA	BMP7
ABCC1	ACHE	ADAMTSL2	AFF1	AKAP9	ALG6	ANKRD26	APOC2	ARL6	ASXL3	ATP5MC2	AXL	BCKDHB	BMPER
ABCC10	ACIN1	ADAMTSL4	AFF2	AKR1B1	ALG8	ANKRD34A	APOC3	ARL6IP1	ATAD3A	ATP5MC3	B2M	BCKDK	BMPR1A
ABCC11	ACKR1	ADAR	AFF3	AKR1C2	ALG9	ANKRD35	APOE	ARMC4	ATAD3B	ATP5ME	B3GALNT1	BCL10	BMPR1B
ABCC12	ACO2	ADAT3	AFF4	AKR1C4	ALK	ANKRD55	APOL1	ARMC5	ATCAY	ATP5MF	B3GALNT2	BCL11A	BMPR2
ABCC2	ACOT9	ADCY1	AFG3L2	AKR1D1	ALLC	ANKS3	APOL2	ARMS2	ATF1	ATP5MG	B3GALT6	BCL2	BMS1
ABCC3	ACOX1	ADCY10	AFF	AKR1E2	ALMS1	ANKS6	APOL4	ARNT	ATF2	ATP5PB	B3GAT3	BCL6	BNC2
ABCC4	ACOX2	ADCY5	AGA	AKT1	ALOX12B	ANLN	APP	ARNT2	ATF6	ATP5PD	B3GLCT	BCO1	BOLA1
ABCC5	ACP2	ADCY6	AGBL1	AKT2	ALOX5	ANO10	APPL1	ARSA	ATG16L1	ATP5PF	B3GNT2	BCOR	BOLA2
ABCC6	ACP4	ADD1	AGBL5	AKT3	ALOXE3	ANO3	APRT	ARSB	ATG2B	ATP5PO	B4GALNT1	BCORL1	BOLA3
ABCC8	ACP5	ADD2	AGGF1	ALAD	ALPK3	ANO5	APTX	ARSF	ATIC	ATP6AP1	B4GALT1	BCR	BPGM
ABCC9	ACSF3	ADD3	AGK	ALAS1	ALPL	ANO6	AQP1	ARSG	ATL1	ATP6AP2	B4GALT7	BCS1L	BPIFA3
ABCD1	ACSL4	ADGRA3	AGL	ALAS2	ALS2	ANOS1	AQP2	ARSI	ATL3	ATP6V0A2	B4GAT1	BDNF	BPIFB6
ABCD3	ACSL6	ADGRG1	AGO1	ALB	ALX1	ANTXR1	AQP3	ARSL	ATM	ATP6V0A4	B9D1	BDP1	BPNT2
ABCD4	ACTA1	ADGRG4	AGPAT2	ALDH18A1	ALX3	ANTXR2	AQP4	ART4	ATN1	ATP6V1B1	B9D2	BEAN1	BRAF
ABCG1	ACTA2	ADGRG6	AGPS	ALDH1A1	ALX4	ANXA11	AQP5	ARTN	ATOH1	ATP6V1B2	BAAT	BEST1	BRAT1

BRCA1	C9	CARD11	CCDC69	CD55	CDSN	CFAP73	CHRNA4	CLCN5	CNTN2	COL7A1	CP	CRYBB3	CTTNBP2
BRCA2	C9orf72	CARD14	CCDC78	CD59	CDT1	CFAP97	CHRNA5	CLCN7	CNTN4	COL8A2	CPA1	CRYGA	CUBN
BRCC3	CA12	CARD9	CCDC8	CD79A	CEACAM16	CFB	CHRNA7	CLCNKA	CNTNAP1	COL9A1	CPA6	CRYGB	CUL3
BRD4	CA2	CARS1	CCDC88C	CD79B	CEBPA	CFC1	CHRNA9	CLCNKB	CNTNAP2	COL9A2	CPB1	CRYGC	CUL4B
BRF1	CA4	CARS2	CCL11	GD81	CEBPE	CFD	CHRNB1	CLDN1	COA1	COL9A3	CPLANE1	CRYGD	CUL7
BRIP1	CA5A	CARTPT	CCL2	CD82	CEL	CFH	CHRNB2	CLDN11	COA3	COLEC11	CPLX1	CRYGS	CUX2
BRPF1	CA8	CASK	CCL3	CD83	CELF6	CFHR1	CHRND	CLDN14	COA5	COLQ	CPN1	CRYM	CWF19L1
BRWD3	CABIN1	CASP10	CCM2	GD8A	CELSR1	CFHR2	CHRNE	CLDN16	COA6	COMP	GPOX	CSF1R	CX3CR1
BSCL2	CABP2	CASP2	CCN2	CD96	CELSR2	CFHR3	CHRNA	CLDN19	COA8	COMT	GPS1	CSF2RA	CXCL10
BSG	CABP4	CASP3	CCN3	CD99	CEMIP	CFHR4	CHST1	CLDN9	COASY	COPA	CPT1A	CSF2RB	CXCL12
BSN	CACNA1A	CASP8	CCN6	GDA	CENPE	CFHR5	CHST10	CLEC4M	COCH	COQ10A	CPT1B	CSF3R	CXCL8
BSND	CACNA1B	CASQ1	CCNA2	CDAN1	CENPF	CFI	CHST11	CLEC7A	COG1	COQ10B	CPT1C	CSNK1D	CXCR1
BTD	CACNA1C	CASQ2	CCNB3	CDC14A	CENPJ	CFL1	CHST12	CLIC2	COG2	COQ2	CPT2	CSNK1G1	CXCR2
BTK	CACNA1D	CASR	CCND1	GDC20	CEP104	CFL2	CHST13	CLIC5	COG4	COQ3	CPXCR1	CSNK2A1	CXCR4
BTRC	CACNA1F	CAST	CCND2	CDC42	CEP120	CFP	CHST14	CLIP1	COG5	COQ4	CR1	CSPP1	CXorf58
BUB1	CACNA1G	CAT	CCNO	CDC45	CEP126	CFTR	CHST2	CLIP2	COG6	COQ5	CR2	CSRP3	CYB5A
BUB1B	CACNA1H	CATSPER1	CCNQ	CDC5L	CEP135	CHAMP1	CHST3	CLMP	COG7	COQ6	CRADD	CT3	CYB5R1
BUB3	CACNA1S	CATSPER2	CCR1	CDC6	CEP152	CHAT	CHST4	CLN3	COG8	COQ7	CRAT	CSTA	CYB5R2
BVES	CACNA2D1	CAV1	CCR5	CDC73	CEP164	CHCHD10	CHST5	CLN5	COL10A1	COQ8A	CRB1	CSTB	CYB5R3
C12orf57	CACNA2D4	CAV3	CCR6	GDCA7	CEP19	CHCHD2	CHST6	CLN6	COL11A1	COQ8B	CRB2	CSTF2	CYB5R4
C19orf12	CACNB2	CAVIN1	CCT5	CDH1	CEP250	CHD1	CHST7	CLN8	COL11A2	COQ9	CRBN	CTBP1	CYB5RL
C1D	CACNB4	CAVIN4	CD109	CDH15	CEP290	CHD1L	CHST8	CLNS1A	COL12A1	CORIN	CREB1	CTC1	CYBA
C1GALT1C1	CACNG2	CBFA2T3	CD151	GDH23	CEP41	CHD2	CHST9	CLP1	COL13A1	CORO1A	CREB3L1	CTCF	CYBB
C1QA	CAD	CBFB	CD164	CDH3	CEP57	CHD4	CHSY1	CLPB	COL14A1	COX10	CREB3L2	CTDP1	CYC1
C1QB	CALCR	CBL	CD177	CDHR1	CEP63	CHD7	CHUK	CLPP	COL17A1	COX14	CREB3L3	CTDSP2	CYCS
C1QC	CALCRL	CBLIF	CD19	CDIN1	CEP78	CHD8	CIB2	CLPS	COL18A1	COX15	CREBBP	CTF1	CYLD
C1QTNF5	CALM1	CBR1	CD207	CDK13	CEP83	CHEK2	CIC	CLRN1	COL1A1	COX20	CRELD1	CTH	CYP11A1
C1R	CALM2	CBR3	CD209	CDK16	CEP89	CHGA	CIDEC	CLTC	COL1A2	COX4I1	CRH	CTHRC1	CYP11B1
C1S	CALM3	CBS	CD244	CDK4	CERKL	CHGB	CIITA	CLTCL1	COL25A1	COX4I2	CRIP1	CTLA4	CYP11B2
C2	CALR	CBX2	CD247	CDK5	CERS1	CHI3L1	CILK1	CMC4	COL27A1	COX5A	CRKL	CTNNA1	CYP17A1
C22orf23	CALR3	CC2D1A	CD27	CDK5RAP2	CERS3	CHIT1	CILP	CNBP	COL2A1	COX5B	CRLF1	CTNNA3	CYP19A1
C2CD2	CAMK2A	CC2D2A	CD28	CDK6	CERT1	CHKB	CISD2	CNDP1	COL3A1	COX6A1	CRLF2	CTNNB1	CYP1A1
C2CD3	CAMK2G	CCBE1	CD2AP	CDK8	CES1	CHL1	CISH	CNGA1	COL4A1	COX6A2	CROT	CTNND2	CYP1A2
C3	CAMKMT	CCDC103	CD320	CDKAL1	CES2	CHM	CITED2	CNGA2	COL4A2	COX6B1	CRPPA	CTNS	CYP1B1
C4A	CAMTA1	CCDC115	CD36	CDKL5	CETP	CHMP1A	CIZ1	CNGA3	COL4A3	COX6B2	CRTAP	CTPS1	CYP20A1
C4B	CANT1	CCDC174	CD3D	CDKN1A	CFAP251	CHMP2B	CKAP2L	CNGB1	COL4A4	COX6C	CRX	CTPS2	CYP21A2
C4BPA	CAP1	CCDC22	CD3E	CDKN1B	CFAP298	CHMP4B	CKB	CNGB3	COL4A5	COX7A1	CRYAA	CTRC	CYP24A1
C5	CAPN1	CCDC28B	CD3G	CDKN1C	CFAP410	CHN1	CLCA2	CNKSR1	COL4A6	COX7A2	CRYAB	CTSA	CYP26A1
C6	CAPN10	CCDC39	CD4	CDKN2A	CFAP418	CHRD1	CLCA4	CNKSR2	COL5A1	COX7B	CRYBA1	CTSC	CYP26B1
C7	CAPN15	CCDC40	CD40	CDKN2B	CFAP44	CHRM3	CLCF1	CNNM2	COL5A2	COX7B2	CRYBA2	CTSD	CYP26C1
C8A	CAPN3	CCDC50	CD40LG	CDKN2C	CFAP47	CHRNA1	CLCN1	CNNM4	COL6A1	COX7C	CRYBA4	CTSF	CYP27A1
C8B	CAPN5	CCDC6	CD44	CDKN2D	CFAP52	CHRNA2	CLCN2	CNOT3	COL6A2	COX8A	CRYBB1	CTSH	CYP27B1
C8G	CAPRIN1	CCDC65	CD46	CDON	CFAP53	CHRNA3	CLCN4	CNTN1	COL6A3	COX8C	CRYBB2	CTSK	CYP2A13

CYP2A6	DAW1	DGCR8	DLC1	DNAI2	DPYS	EBF3	EIF2S2	EPB41L1	ESR2	FAM111A	FBXW4	FIG4	FOXD2
CYP2A7	DBH	DGKE	DLD	DNAJB1	DRAM2	EBP	EIF2S3	EPB42	ESRRB	FAM111B	FCGR1A	FIGLA	FOXD3
CYP2B6	DBT	DGKH	DLEC1	DNAJB13	DRC1	ECE1	EIF4A3	EPCAM	ESS2	FAM120C	FCGR2A	FIGN	FOXE1
CYP2C18	DCAF17	DGKQ	DLG1	DNAJB2	DRD2	ECEL1	EIF4E	EPG5	ESX1	FAM124B	FCGR2B	FIP1L1	FOXE3
CYP2C19	DCAF8	DGUOK	DLG2	DNAJB6	DRD3	ECHS1	EIF4ENIF1	EPHA2	ETF1	FAM126A	FCGR3A	FKBP10	FOXF1
CYP2C8	DCC	DHCR24	DLG3	DNAJC13	DRD4	ECM1	EIF4G1	EPHA4	ETFA	FAM13A	FCGR3B	FKBP14	FOXF2
CYP2C9	DCDC2	DHCR7	DLG4	DNAJC19	DRD5	ECSIT	EIF4G2	EPHB1	ETFB	FAM161A	FCGRT	FKBP5	FOXG1
CYP2D6	DCHS1	DHDDS	DLK1	DNAJC21	DRP2	EDA	ELAC2	EPHB2	ETFDH	FAM20A	FCN1	FKBPL	FOXH1
CYP2D7	DCHS2	DHFR	DLL1	DNAJC3	DSC1	EDA2R	ELANE	EPHB3	ETHE1	FAM20C	FCN2	FKRP	FOXI1
CYP2E1	DCLRE1B	DHFRL1	DLL3	DNAJC5	DSC2	EDAR	ELF4	EPHB4	ETV1	FAM47B	FCN3	FKTN	FOXI3
CYP2F1	DCLRE1C	DHH	DLL4	DNAJC6	DSC3	EDARADD	ELK1	EPHX1	ETV4	FAM83H	FCRL6	FLAD1	FOXL1
CYP2J2	DCN	DHODH	DLST	DNAL1	DSE	EDC3	ELL	EPHX2	ETV6	FAN1	FDPS	FLCN	FOXL2
CYP2R1	DCPS	DHRS1	DLX2	DNAL4	DSG1	EDN1	ELMOD2	EPM2A	EVC	FANCA	FDX1	FLG	FOXN1
CYP2S1	DCTN1	DHRS12	DLX3	DNASE1	DSG2	EDN3	ELMOD3	EPO	EVC2	FANCB	FDX2	FLI1	FOXN2
CYP2U1	DCTN4	DHRS13	DLX4	DNASE1L3	DSG4	EDNRA	ELN	EPOR	EWSR1	FANCC	FECH	FLII	FOXO1
CYP39A1	DCX	DHRS2	DLX5	DNM1	DSP	EDNRB	ELOVL4	EPPK1	EXOSC3	FANCD2	FERMT1	FLNA	FOXO4
CYP3A4	DCXR	DHRS3	DLX6	DNM1L	DSP	EEF1A2	ELOVL5	EPRS1	EXOSC8	FANCE	FERMT3	FLNB	FOXP1
CYP3A43	DDB1	DHRS4	DMAC2	DNM2	DST	EEF1B2	ELP1	EPS8	EXPH5	FANCF	FEZF1	FLNC	FOXP2
CYP3A5	DDB2	DHRS4L1	DMAC2L	DNMT1	DSTYK	EEF2	ELP2	EPS8L3	EXT1	FANCG	FFAR4	FLRT1	FOXP3
CYP3A7	DDC	DHRS4L2	DMD	DNMT3A	DTD1	EFCAB13	ELP4	EPX	EXT2	FANCI	FGA	FLRT3	FOXRED1
CYP46A1	DDHD1	DHRS7	DMGDH	DNMT3B	DTHD1	EFEMP1	EMC1	ERAP1	EYA1	FANCL	FGB	FLT3	FPR1
CYP4A11	DDHD2	DHRS7B	DMP1	DOCK11	DTNA	EFEMP2	EMD	ERBB2	EYA4	FANCM	FGD1	FLT4	FRAS1
CYP4B1	DDIT3	DHRS7C	DMPK	DOCK2	DTNBP1	EFHC1	EMG1	ERBB3	EYS	FAR1	FGD4	FLVCR1	FREM1
CYP4F11	DDO	DHRS9	DMRT1	DOCK6	DUOX1	EFNA4	EML1	ERBB4	EZH2	FARS2	FGF10	FLVCR2	FREM2
CYP4F12	DDOST	DHRSX	DMTF1	DOCK7	DUOX2	EFNB1	EML4	ERC1	EZR	FAS	FGF12	FMN1	FRG1
CYP4F2	DDR1	DHTKD1	DMTN	DOCK8	DUOXA2	EFTUD2	EMP2	ERC2	F10	FASLG	FGF14	FMN2	FRMD4A
CYP4F22	DDR2	DHX30	DMXL2	DOK7	DUS2	EGF	EMX2	ERCC1	F11	FASN	FGF16	FMO1	FRMD7
CYP4F3	DDX11	DHX38	DNA2	DOLK	DUSP6	EGFR	EN2	ERCC2	F12	FASTKD2	FGF17	FMO2	FRMPD4
CYP4F8	DDX39A	DIABLO	DNAAF1	DOLPP1	DVL1	EGLN1	ENAM	ERCC3	F13A1	FAT1	FGF20	FMO3	FRRS1L
CYP4V2	DDX3X	DIAPH1	DNAAF10	DPAGT1	DVL2	EGLN2	ENG	ERCC4	F13B	FAT4	FGF23	FMO4	FRS2
CYP4Z1	DDX41	DIAPH2	DNAAF2	DPEP1	DVL3	EGLN3	ENKD1	ERCC5	F2	FBF1	FGF3	FMO5	FRY
CYP51A1	DDX53	DIAPH3	DNAAF3	DPF1	DYM	EGR2	ENKUR	ERCC6	F5	FBLN1	FGF5	FMO6P*	FRZB
CYP7A1	DDX58	DICER1	DNAAF4	DPF2	DYNC1H1	EHBP1	ENO1	ERCC6L2	F7	FBLN5	FGF8	FMR1	FSCN2
CYP7B1	DDX59	DIO2	DNAAF5	DPF3	DYNC2H1	EHHADH	ENO3	ERCC8	F8	FBN1	FGF9	FN1	FSHB
CYP8B1	DEAF1	DIO3	DNAAF6	DPH1	DYNC211	EHMT1	ENOX2	ERF	F9	FBN2	FGFR1	FNBP4	FSHR
D2HGDH	DECR1	DIP2B	DNAH1	DPM1	DYNC2I2	EIF1AX	ENPP1	ERG	FA2H	FBP1	FGFR2	FNIP1	FTCD
DAB2	DEK	DIRC2	DNAH11	DPM2	DYNC2LI1	EIF2AK3	ENPP3	ERLIN1	FAAH	FBP2	FGFR3	FOLR1	FTH1
DACT1	DENND5A	DIS3L2	DNAH2	DPM3	DYRK1A	EIF2AK4	ENTPD1	ERLIN2	FAAH2	FBXL4	FGFRL1	FOLR2	FTL
DAG1	DEPDC5	DISC1	DNAH5	DPP10	DYRK1B	EIF2B1	EOGT	ERMAP	FABP4	FBXO2	FGG	FOLR3	FTO
DAO	DES	DISP1	DNAH6	DPP6	DYSF	EIF2B2	EOMES	ERMARD	FADD	FBXO25	FH	FOS	FTSJ1
DAOA	DGAT1	DKC1	DNAH8	DPP9	E2F1	EIF2B3	EP300	ESCO2	FADS2	FBXO31	FHIT	FOXA1	FUCA1
DARS1	DGCR2	DKK1	DNAH9	DPY19L2	E2F3	EIF2B4	EPAS1	ESPN	FAF1	FBXO38	FHL1	FOXC1	FUS
DARS2	DGCR6	DLAT	DNAI1	DPYD	EARS2	EIF2B5	EPB41	ESR1	FAH	FBXO7	FHL2	FOXC2	FUT1

FUT2	GALNS	GDF6	GLI1	GOLGA5	GRHPR	GSTT1	HBD	HINT1	HOXA13	HSPD1	IFT88	IL21	IRF4
FUT6	GALNT11	GDI1	GLI2	GON4L	GRIA1	GSTT2	HBE1	HIRA	HOXA2	HSPG2	IGBP1	IL21R	IRF5
FUZ	GALNT12	GDNF	GLI3	GORAB	GRIA2	GSTZ1	HBG1	HIVEP2	HOXB1	HTR1A	IGF1	IL23A	IRF6
FXN	GALNT3	GFAP	GLIS2	GOSR2	GRIA3	GTF2E2	HBG2	HJV	HOXB13	HTR2A	IGF1R	IL23R	IRF7
FXYD2	GALT	GFER	GLIS3	GOT1	GRID1	GTF2H5	HBM	HK1	HOXC13	HTRA1	IGF2	IL27	IRF8
FYCO1	GAMT	GFI1	GLMN	GP1BA	GRID2	GTF2I	HBQ1	HK2	HOXD1	HTRA2	IGF2BP2	IL2RA	IRGM
FZD2	GAN	GFI1B	GLP1R	GP1BB	GRIK2	GTF2IRD1	HBZ	HLA-A	HOXD10	HTT	IGF2R	IL2RB	IRS1
FZD3	GAPDH	GFM1	GLRA1	GP6	GRIK5	GTPBP3	HCCS	HLA-B	HOXD13	HUWE1	IGFALS	IL2RG	IRS2
FZD4	GARS1	GFM2	GLRA2	GP9	GRIN1	GTPBP8	HCFC1	HLA-C	HP	HYAL1	IGFBP1	IL31RA	IRX4
FZD5	GAS1	GFPT1	GLRB	GPC1	GRIN2A	GUCA1A	HCN1	HLA-DPB1	HPCA	HYDIN	IGFBP3	IL36RN	IRX5
FZD6	GAS8	GFRA1	GLRX5	GPC3	GRIN2B	GUCA1B	HCN3	HLA-DQA1	HPD	HYKK	IGFBP7	IL3RA	ISCA1
FZR1	GASK1B	GGCX	GLS	GPC4	GRIN2D	GUCY1A1	HCN4	HLA-DQB1	HPGD	HYLS1	IGHG2	IL4R	ISCA2
G6PC	GATA1	GGH	GLS2	GPC6	GRIP1	GUCY2C	HCRT	HLA-DRA	HPRT1	IAPP	IGHM	IL6	ISCU
G6PC3	GATA2	GGT1	GLUD1	GPD1	GRK1	GUCY2D	HDAC4	HLA-DRB1	HPS1	IARS2	IGHMBP2	IL6R	ISG15
G6PD	GATA3	GH1	GLUL	GPD1L	GRM1	GUSB	HDAC5	HLCS	HPS3	IBA57	IGKC	IL7R	ISL1
GAA	GATA4	GHR	GLYCTK	GPHN	GRM3	GYG1	HDAC6	HLF	HPS4	ICAM1	IGLL1	ILDR1	ITCH
GAB3	GATA5	GHRHR	GM2A	GPI	GRM6	GYG2	HDAC8	HMBS	HPS5	ICAM4	IGSF1	ILK	ITGA10
GABBR1	GATA6	GHRL	GMNN	GPIHBP1	GRM7	GYP A	HDAC9	HMCN1	HPS6	ICOS	IGSF3	IMPDH1	ITGA2
GABBR2	GATAD1	GHSR	GMPPA	GPR101	GRN	GYPB	HDC	HMGA2	HPSE2	IDH1	IHH	IMPG1	ITGA2B
GABRA1	GATAD2B	GIGYF2	GMPPB	GPR143	GRXCR1	GYPC	HECW2	HMGB3	HR	IDH2	IKBKB	IMPG2	ITGA3
GABRA2	GATB	GIPC2	GNA11	GPR161	GRXCR2	GY1	HELLS	HMGCL	HRAS	IDH3B	IKBKG	INF2	ITGA4
GABRA3	GATC	GIPC3	GNA12	GPR179	GSC	GSY2	HEPACAM	HMGCS2	HRG	IDS	IKZF1	ING1	ITGA6
GABRA4	GATM	GJA1	GNA13	GPR180	GSDME	H3-4	HEPH	HMMR	HS6ST1	IDUA	IKZF3	INHA	ITGA7
GABRA5	GBA	GJA3	GNAI1	GPR35	GSKIP	H4C2	HERC1	HMOX1	HS6ST2	IER3IP1	IL10	INHBA	ITGA8
GABRA6	GBA2	GJA5	GNAI2	GPR88	GSN	H6PD	HERC2	HMX1	HSD11B1	IFIH1	IL10RA	INPP4A	ITGA9
GABRB1	GBE1	GJA8	GNAI3	GPRASP1	GSPT2	HABP2	HES1	HMX2	HSD11B2	IFITM3	IL10RB	INPP5E	ITGAM
GABRB2	GBP2	GJB1	GNAL	GPRIN1	GSR	HACD1	HES5	HMX3	HSD17B10	IFITM5	IL11	INPP5K	ITGB1
GABRB3	GBX2	GJB2	GNAO1	GPRIN2	GSS	HACE1	HES7	HNF1A	HSD17B11	IFNAR2	IL11RA	INPPL1	ITGB2
GABRD	GCDH	GJB3	GNAQ	GPSM2	GSTA1	HADH	HESX1	HNF1B	HSD17B14	IFNG	IL12A	INS	ITGB3
GABRE	GCGR	GJB4	GNAS	GPT2	GSTA2	HADHA	HEXA	HNF4A	HSD17B2	IFNGR1	IL12B	INSL3	ITGB4
GABRG1	GCH1	GJB5	GNAT1	GPX1	GSTA3	HADHB	HEXB	HNMT	HSD17B3	IFNGR2	IL12RB1	INSR	ITGB6
GABRG2	GCK	GJB6	GNAT2	GPX2	GSTA4	HAGH	HFE	HNRNPA1	HSD17B4	IFNL3	IL12RB2	INTS6L	ITIH4
GABRG3	GCKR	GJC2	GNB1	GPX3	GSTA5	HAL	HFM1	HNRNPA2B1	HSD17B7	IFNL4	IL13	INVS	ITIH6
GABRP	GCLC	GJC3	GNB3	GPX4	GSTCD	HAMP	HGD	HNRNPD1	HSD17B7P2*	IFRD1	IL17A	IPMK	ITK
GABRQ	GCLM	GJE1	GNB4	GPX5	GSTK1	HAND2	HGF	HNRNPH1	HSD3B1	IFT122	IL17D	IPPK	ITM2B
GABRR1	GCM2	GK	GNE	GPX6	GSTM1	HARS1	HGSNAT	HNRNPH2	HSD3B2	IFT140	IL17F	IQCB1	ITPA
GABRR2	GCNT2	GK2	GNMT	GPX7	GSTM2	HARS2	HHAT	HNRNPK	HSD3B7	IFT172	IL17RA	IQCE	ITPKC
GABRR3	GCSH	GLA	GNPAT	GRAMD1B	GSTM3	HAUS7	HIBCH	HNRNPU	HSF4	IFT27	IL17RC	IQSEC2	ITPR1
GAD1	GDAP1	GLB1	GNPTAB	GRB14	GSTM4	HAVCR1	HIC1	HOGA1	HSPA9	IFT43	IL17RD	IRAK1	ITPR2
GAL	GDF1	GLCCI1	GNPTG	GREM1	GSTM5	HAX1	HIF1A	HOMER2	HSPB1	IFT46	IL18	IRAK3	ITPR3
GALC	GDF2	GLDC	GNRH1	GREM2	GSTO1	HBA1	HIF1AN	HOOK1	HSPB3	IFT74	IL1B	IRAK4	IVD
GALE	GDF3	GLDN	GNRHR	GRHL2	GSTO2	HBA2	HIF3A	HOXA1	HSPB8	IFT80	IL1RAPL1	IRF1	IYD
GALK1	GDF5	GLE1	GNS	GRHL3	GSTP1	HBB	HIKESHI	HOXA11	HSPBAP1	IFT81	IL1RN	IRF3	JAG1



JAG2	KCNJ10	KIDINS220	KLHL9	LACC1	LGR4	LOXHD1	LZTFL1	MAP4K2	MCOLN3	MGST2	MMP20	MRPL2	MRPS18B
JAGN1	KCNJ11	KIF11	KLK1	LACTB	LHB	LOXL1	LZTR1	MAP7D3	MCPH1	MGST3	MMP21	MRPL20	MRPS18C
JAK1	KCNJ12	KIF14	KLK4	LAD1	LHCGR	LOXL3	LZTS1	MAPK1	MCTP2	MIB1	MMP3	MRPL21	MRPS2
JAK2	KCNJ13	KIF1A	KLKB1	LAMA1	LHFPL3	LPA	MAB21L2	MAPK10	MCU	MICA	MMP9	MRPL22	MRPS21
JAK3	KCNJ16	KIF1B	KLLN	LAMA2	LHFPL5	LPAR6	MAD2L2	MAPK13	MDH2	MICU1	MMUT	MRPL23	MRPS22
JAM3	KCNJ18	KIF1C	KLRC4	LAMA3	LHX1	LPIN1	MAF	MAPK15	MDM2	MICU2	MN1	MRPL24	MRPS23
JAZF1	KCNJ2	KIF21A	KMT2A	LAMA4	LHX3	LPIN2	MAFB	MAPK8IP1	MECOM	MID1	MNS1	MRPL27	MRPS24
JMJD1C	KCNJ5	KIF22	KMT2B	LAMA5	LHX4	LPIN3	MAG	MAPKBP1	MECP2	MID2	MNX1	MRPL28	MRPS25
JPH2	KCNJ6	KIF23	KMT2C	LAMB1	LIAS	LPL	MAGEA11	MAPRE2	MECR	MIF	MOB4	MRPL3	MRPS26
JPH3	KCNJ8	KIF26A	KMT2D	LAMB2	LIFR	LRAT	MAGEB1	MAPT	MED12	MINPP1	MOCOS	MRPL32	MRPS27
JRK	KCNK12	KIF26B	KMT5B	LAMB3	LIG1	LRBA	MAGEB10	MARS1	MED13	MIP	MOCOS1	MRPL33	MRPS28
JUN	KCNK18	KIF2A	KNG1	LAMC1	LIG4	LRIG1	MAGEB2	MARS2	MED13L	MIPEP	MOCOS2	MRPL34	MRPS30
JUP	KCNK3	KIF4A	KNL1	LAMC2	LIM2	LRIG2	MAGEC1	MARVELD2	MED17	MIR17HG	MOG	MRPL35	MRPS31
KANK1	KCNK9	KIF5A	KPNA7	LAMC3	LIMK1	LRIG3	MAGEC3	MASP1	MED23	MIR182	MOGAT2	MRPL36	MRPS33
KANK2	KCNMA1	KIF5C	KPTN	LAMP2	LIMS2	LRIT3	MAGED1	MASP2	MED25	MIR183	MOGS	MRPL37	MRPS34
KANSL1	KCNMB1	KIF7	KRAS	LAMTOR2	LIN28B	LRMDA	MAGED2	MASTL	MED9	MIR184	MORC2	MRPL38	MRPS35
KARS1	KCNN1	KIFBP	KRIT1	LARGE1	LINS1	LRP1	MAGEE2	MAT1A	MIF2A	MIR204	MORC4	MRPL39	MRPS36
KAT2B	KCNN4	KIR3DL1	KRT1	LARP7	LINS1	LRP2	MAGEL2	MAT2A	MEF2C	MIR2861	MOS	MRPL4	MRPS5
KAT6A	KCNQ1	KIRREL3	KRT10	LARS1	LIPA	LRP4	MAGI1	MATN3	MEFV	MIR96	MPC1	MRPL40	MRPS6
KAT6B	KCNQ2	KISS1	KRT12	LARS2	LIPC	LRP5	MAGI2	MATR3	MEGF10	MITF	MPDU1	MRPL41	MRPS7
KATNA1	KCNQ3	KISS1R	KRT13	LAS1L	LIPE	LRP6	MAGIX	MAX	MEGF8	MKKS	MPDZ	MRPL42	MRPS9
KATNB1	KCNQ4	KIT	KRT14	LBR	LIPH	LRP8	MAGT1	MBD1	MEIS2	MKRN3	MPI	MRPL43	MRRF
KATNIP	KCNT1	KITLG	KRT16	LCA5	LIP1	LRPAP1	MAK	MBD5	MEN1	MKS1	MPL	MRPL44	MRTFA
KBTBD13	KCNV2	KIZ	KRT17	LCAT	LIPN	LRPPRC	MALT1	MBL2	MEOX1	MLC1	MPLKIP	MRPL45	MS4A1
KCNA1	KCTD1	KL	KRT2	LCK	LIPT1	LRRC56	MAMLD1	MBNL3	MERTK	MLH1	MPO	MRPL46	MS4A2
KCNA2	KCTD11	KLC2	KRT25	LCP1	LIPT2	LRRC6	MAN1B1	MBOAT7	MESP2	MLH3	MPP3	MRPL47	MSH2
KCNA3	KCTD17	KLF1	KRT3	LCT	LITAF	LRRC8A	MAN2A1	MBTPS2	MET	MLLT10	MPV17	MRPL48	MSH3
KCNA4	KCTD7	KLF10	KRT4	LDB3	LIX1L	LRRK1	MAN2B1	MC1R	METAP1	MLLT11	MPZ	MRPL49	MSH6
KCNA5	KDM1A	KLF11	KRT5	LDHA	LMAN1	LRRK2	MAN2C1	MC2R	METTL23	MLLT3	MR1	MRPL50	MSL3
KCNAB2	KDM5A	KLF13	KRT6A	LDHB	LMAN2L	LRSAM1	MANBA	MC3R	MFAP5	MLPH	MRAP	MRPL51	MSMB
KCNB1	KDM5B	KLF6	KRT6B	LDLR	LMBR1	LRTOMT	MAOA	MC4R	MFF	MLXIPL	MRAP2	MRPL52	MSMO1
KCNC1	KDM5C	KLF8	KRT6C	LDLRAP1	LMBRD1	LSS	MAOB	MCCC1	MFN2	MLYCD	MRE11	MRPL53	MSN
KCNC3	KDM6A	KLHDC8B	KRT71	LEF1	LMF1	LTA	MAP1A	MCCC2	MFRP	MMAA	MRPL1	MRPL54	MSR1
KCND1	KDM6B	KLHL10	KRT74	LEFTY2	LMNA	LTBP2	MAP2	MCEE	MFSD2A	MMAB	MRPL10	MRPL55	MSRA
KCND3	KDR	KLHL15	KRT75	LEMD3	LMNB1	LTBP3	MAP2K1	MCF2	MFSD6L	MMACHC	MRPL11	MRPL9	MSRB3
KCNE1	KERA	KLHL21	KRT81	LEP	LMNB2	LTBP4	MAP2K2	MCFD2	MFSD8	MMADHC	MRPL12	MRPS10	MST1
KCNE2	KHDC3L	KLHL24	KRT83	LEPR	LMO1	LTC4S	MAP3K1	MCIDAS	MGARP	MME	MRPL13	MRPS11	MSTN
KCNE3	KHK	KLHL3	KRT85	LETM1	LMO4	LY6E	MAP3K13	MCM2	MGAT2	MMEL1	MRPL14	MRPS12	MSX1
KCNE5	KHSRP	KLHL34	KRT86	LFNG	LMOD3	LYRM4	MAP3K14	MCM4	MGAT5B	MMP1	MRPL15	MRPS14	MSX2
KCNH1	KIAA0319	KLHL4	KRT9	LGALS1	LMX1A	LYRM7	MAP3K15	MCM6	MGME1	MMP13	MRPL16	MRPS15	MT2A
KCNH2	KIAA0319L	KLHL40	KYNU	LGALS12	LMX1B	LYST	MAP3K20	MCM8	MGMT	MMP14	MRPL17	MRPS16	MT3
KCNH5	KIAA0586	KLHL41	L1CAM	LGALS2	LONP1	LYVE1	MAP3K5	MCM9	MGP	MMP19	MRPL18	MRPS17	MTAP
KCNJ1	KIAA1549	KLHL7	L2HGDH	LGI1	LORICRIN	LYZ	MAP3K6	MCOLN1	MGST1	MMP2	MRPL19	MRPS18A	MTCH1

MTF1	MYH7	NANOS1	NDUFA4	NELFA	NLRP2	NPTX2	NTRK3	OPN1SW	PACS1	PCM1	PDYN	PHF11	PINK1
MTFMT	MYH7B	NANOS2	NDUFA5	NEU1	NLRP3	NR0B1	NUAK1	OPRD1	PADI4	PCNA	PDZD7	PHF21A	PIP4K2A
MTHFD1	MYH8	NANOS3	NDUFA6	NEUROD1	NLRP7	NR0B2	NUBPL	OPRK1	PADI6	PCNT	PECR	PHF6	PIP5K1C
MTHFR	MYH9	NARS1	NDUFA8	NEUROG1	NME1	NR1H4	NUDT1	OPRM1	PAFAH1B1	PCSK1	PEG3	PHF8	PIR
MTM1	MYL2	NARS2	NDUFB1	NEUROG3	NME8	NR1I2	NUDT15	OPTN	PAH	PCSK9	PEPD	PHGDH	PITPNM3
MTMR1	MYL3	NAT1	NDUFB10	NEXMIF	NMNAT1	NR1I3	NUDT19	OR13H1	PAK3	PCYT1A	PER2	PHIP	PITRM1
MTMR14	MYL4	NAT2	NDUFB11	NEXN	NNMT	NR2E3	NUMA1	OR2J3	PALB2	PDAP1	PER3	PHKA1	PITX1
MTMR2	MYLIP	NAT8	NDUFB2	NF1	NNT	NR2F1	NUP107	OR5M1	PALLD	PDCD10	PET100	PHKA2	PITX2
MTMR8	MYLK	NAT8L	NDUFB3	NF2	NOBOX	NR2F2	NUP155	ORA1	PAM16	PDCD6IP	PEX1	PHKB	PITX3
MTNR1B	MYLK2	NAV2	NDUFB4	NFATC1	NOD2	NR3C1	NUP188	ORC1	PANK2	PDE10A	PEX10	PHKG1	PJA1
MTO1	MYO15A	NAXE	NDUFB5	NFIA	NODAL	NR3C2	NUP205	ORC4	PAPPA2	PDE11A	PEX11B	PHKG2	PJVK
MTOR	MYO16	NBAS	NDUFB6	NFIX	NOG	NR4A2	NUP214	ORC6	PAPSS2	PDE3A	PEX12	PHOX2A	PKD1
MTPAP	MYO18B	NBEAL2	NDUFB7	NFKB1	NOL3	NR4A3	NUP62	ORMDL3	PARD3	PDE3B	PEX13	PHOX2B	PKD2
MTR	MYO1A	NBN	NDUFB8	NFKB2	NONO	NR5A1	NUP93	OS9	PARK7	PDE4D	PEX14	PHYH	PKHD1
MTRFR	MYO1C	NCF1	NDUFB9	NFKBIA	NOP10	NRAS	NUTM1	OSBP2	PARN	PDE6A	PEX16	PHYKPL	PKHD1L1
MTRR	MYO1D	NCF2	NDUFC1	NFS1	NOP56	NRCAM	NUTM2A	OSMR	PARP1	PDE6B	PEX19	PI4K2A	PKLR
MTSS1	MYO1E	NCF4	NDUFC2	NFU1	NOS1	NRG1	NUTM2B	OSTM1	PARS2	PDE6C	PEX2	PI4KA	PKNOX1
MTPP	MYO1F	NCOA2	NDUFS1	NGF	NOS1AP	NRK	NXF5	OTC	PASD1	PDE6D	PEX26	PIAS3	PKP1
MUC1	MYO1G	NCOA4	NDUFS2	NGLY1	NOS2	NRL	NYNRIN	OTOA	PASK	PDE6G	PEX3	PIBF1	PKP2
MUC2	MYO3A	NCR3	NDUFS3	NHEJ1	NOS3	NRTN	NYX	OTOF	PAX1	PDE6H	PEX5	PICALM	PLA2G5
MUC5AC	MYO5A	NCSTN	NDUFS4	NHLRC1	NOSTRIN	NRXN1	OAS1	OTOG	PAX2	PDE8B	PEX5L	PICK1	PLA2G6
MUC5B	MYO5B	NDE1	NDUFS5	NHP2	NOTCH1	NRXN2	OAT	OTOGL	PAX3	PDGFB	PEX6	PIEZO1	PLA2G7
MUC7	MYO6	NDN	NDUFS6	NHS	NOTCH2	NRXN3	OBSCN	OTOP1	PAX4	PDGFD	PEX7	PIEZO2	PLAC1
MUCL3	MYO7A	NDP	NDUFS7	NIN	NOTCH3	NSD1	OBSL1	OTOR	PAX5	PDGFRA	PFKL	PIGA	PLAG1
MUSK	MYO9B	NDRG1	NDUFS8	NIPA1	NOX1	NSD2	OC90	OTX1	PAX6	PDGFRB	PFKM	PIGG	PLAGL1
MUTYH	MYOC	NDST1	NDUFV1	NIPA2	NOX3	NSDHL	OCA2	OTX2	PAX7	PDGFRL	PFN1	PIGL	PLAT
MVD	MYOM1	NDUFA1	NDUFV2	NIPAL1	NOXO1	NSMCE2	OCLN	OVOL2	PAX8	PDHA1	PGA3	PIGM	PLAU
MVK	MYOM2	NDUFA10	NDUFV3	NIPAL4	NPAP1	NSMCE3	OCRL	OXA1L	PAX9	PDHB	PGAM1	PIGN	PLCB1
MXI1	MYOT	NDUFA11	NEB	NIPBL	NPC1	NSMCE3	ODAD1	OXCT1	PAXIP1	PDHX	PGAM2	PIGO	PLCB4
MXRA5	MYOZ2	NDUFA12	NEBL	NKAP	NPC2	NSMF	ODAD3	OXTR	PBRM1	PDK1	PGAP1	PIGQ	PLCD1
MYB	MYPN	NDUFA13	NECAB2	NKX2-1	NPHP1	NSUN2	ODAPH	P2RX1	PBX1	PDK2	PGAP2	PIGT	PLCE1
MYBPC1	MYT1L	NDUFA2	NECAP1	NKX2-2	NPHP3	NT5C	ODF2L	P2RX2	PC	PDK3	PGAP3	PIGV	PLCG2
MYBPC3	NAA10	NDUFA3	NECTIN1	NKX2-5	NPHP4	NT5C2	OFD1	P2RY12	PCARE	PDK4	PGD	PIGW	PLCXD1
MYC	NAA15	NDUFA4	NECTIN3	NKX2-6	NPHS1	NT5C3A	OGDH	P2RY4	PCBD1	PDLIM3	PGK1	PIGY	PLCZ1
MYCN	NAB2	NDUFA5	NECTIN4	NKX3-1	NPHS2	NT5E	OGG1	P2RY8	PCCA	PDLIM4	PGM1	PIK3C3	PLD3
MYD88	NABP1	NDUFA6	NEDD4L	NKX3-2	NPM1	NTF3	OGT	P3H1	PCCB	PDP1	PGM3	PIK3CA	PLEC
MYDGF	NADK2	NDUFA7	NEFH	NLGN2	NPPA	NTF4	OLR1	P3H2	PCDH10	PDP2	PGR	PIK3CD	PLEKHA1
MYF6	NAGA	NDUFA8	NEFL	NLGN3	NPPC	NTHL1	OPA1	P4HA2	PCDH15	PDPK1	PGRMC1	PIK3R1	PLEKHG2
MYH11	NAGLU	NDUFA9	NEK1	NLGN4X	NPR2	NTM	OPA3	P4HB	PCDH19	PDPR	PHACTR1	PIK3R2	PLEKHG4
MYH14	NAGPA	NDUFAB1	NEK2	NLGN4Y	NPR3	NTN1	OPHN1	PABPC4L	PCGF2	PDSS1	PHB1	PIK3R5	PLEKHG5
MYH2	NAGS	NDUFAF1	NEK4	NLRC4	NPRL2	NTNG1	OPLAH	PABPC5	PCK1	PDSS2	PHC1	PIKFYVE	PLEKHM1
MYH3	NAIP	NDUFAF2	NEK8	NLRP1	NPRL3	NTRK1	OPN1LW	PABPN1	PCK2	PDX1	PHEX	PIN1	PLG
MYH6	NALCN	NDUFAF3	NEK9	NLRP12	NPSR1	NTRK2	OPN1MW	PACRG	PCLO	PDXK	PHF10	PIN4	PLGLB1

PLIN1	POLD1	PPOX	PRKD2	PSMA6	PTRH1	RAD54B	RDH5	RIPOR2	RP1L1	RSPH3	SATB2	SDS	SET
PLK1	POLE	PPP1CB	PRKDC	PSMA7	PTRH2	RAD54L	RDX	RIPPLY2	RP2	RSPH4A	SAV1	SEC14L2	SETBP1
PLK4	POLG	PPP1R15B	PRKG1	PSMB4	PTS	RAF1	RECQL	RIT1	RP9	RSPH9	SBDS	SEC14L3	SETD1A
PLN	POLG2	PPP1R17	PRKN	PSMB8	PUDP	RAG1	RECQL4	RLBP1	RPE65	RSPO1	SBF1	SEC16B	SETD2
PLOD1	POLH	PPP1R3A	PRKRA	PSMB9	PUF60	RAG2	REEP1	RLIM	RPGR	RSPO4	SBF2	SEC23A	SETD5
PLOD2	POLQ	PPP1R8	PRLR	PSMC3IP	PURA	RAI1	REEP2	RMDN2	RPGRIP1	RSPRY1	SC5D	SEC23B	SETDB1
PLOD3	POLR1A	PPP2R1A	PRM2	PSMD10	PUS1	RALGDS	REEP6	RMND1	RPGRIP1L	RTEL1	SCAPER	SEC24D	SETDB2
PLP1	POLR1C	PPP2R1B	PRMT7	PSPH	PUS3	RANBP2	RELA	RMRP	RPIA	RTL1	SCARB1	SEC61A1	SETX
PLPBP	POLR1D	PPP2R2B	PRMT9	PSTK	PXDN	RANGRF	RELN	RNASE1	RPL10	RTL9	SCARB2	SEC63	SF3B1
PLPP6	POLR1G	PPP2R5D	PRNP	PSTPIP1	PXMP2	RAP1A	REN	RNASE12	RPL10A	RTN2	SCARF2	SECISBP2	SF3B4
PLS3	POLR2D	PPP6C	PROC	PTCD1	PYCR1	RAP1B	RENBP	RNASE3	RPL11	RTN3	SCGB1D1	SELE	SFPQ
PLXNA1	POLR3A	PPT1	PRODH	PTCH1	PYCR2	RAPGEF1	RERE	RNASEH1	RPL15	RTN4IP1	SCGB3A2	SELENON	SFTPA1
PLXNB3	POLR3B	PPY	PROK2	PTCH2	PYDC1	RAPSN	REST	RNASEH2A	RPL19	RTN4R	SCLT1	SELP	SFTPA2
PLXND1	POLR3GL	PQBP1	PROKR2	PTCHD1	PYGL	RARA	RET	RNASEH2B	RPL21	RTTN	SCN10A	SEM1	SFTPB
PM20D1	POMC	PRB3	PROM1	PTDSS1	PYGM	RARB	RETN	RNASEH2C	RPL26	RUBCN	SCN11A	SEMA3A	SFTPC
PMEL	POMGNT1	PRCC	PROP1	PTEN	PYROXD1	RARG	RETREG1	RNASEL	RPL27	RUNX1	SCN1A	SEMA3C	SFTPD
PML	POMGNT2	PRCD	PROS1	PTF1A	QARS1	RARS1	REV3L	RNASET2	RPL34	RUNX1T1	SCN1B	SEMA3D	SFXN4
PMM2	POMK	PRDM12	PROX2	PTGDR	QDPR	RARS2	RFC2	RNF113A	RPL35A	RUNX2	SCN2A	SEMA3E	SGCA
PMP22	POMP	PRDM16	PROZ	PTGER2	QKI	RASA1	RFT1	RNF125	RPL5	RUVBL2	SCN2B	SEMA4A	SGCB
PMPCA	POMT1	PRDM5	PRPF3	PTGIS	QRICH1	RASA2	RFX5	RNF128	RPL9	RXFP2	SCN3A	SEMA5A	SGCD
PMS1	POMT2	PRDM6	PRPF31	PTH	QRS1	RASGRP2	RFX6	RNF135	RPN1	RXRA	SCN3B	SEMA7A	SGCE
PMS2	PON1	PRDM8	PRPF4	PTH1R	RAB18	RASSF1	RFXANK	RNF139	RPS10	RXYLT1	SCN4A	SEPSECS	SGCG
PMVK	PON2	PRDX3	PRPF6	PTHLH	RAB23	RASSF8	RFXAP	RNF168	RPS14	RYK	SCN4B	SEPTIN12	SGO1
PNKD	PON3	PRDX4	PRPF8	PTK2B	RAB27A	RAX	RGL4	RNF170	RPS15	RYR1	SCN5A	SEPTIN14	SGSH
PNKP	POP1	PRDX6	PRPH	PTK7	RAB28	RAX2	RGN	RNF2	RPS15A	RYR2	SCN8A	SEPTIN9	SH2B1
PNLIP	POR	PREPL	PRPH2	PTPN1	RAB33B	RB1	RGR	RNF213	RPS17	RYR3	SCN9A	SERAC1	SH2B3
PNMT	PORCN	PREX2	PRPS1	PTPN11	RAB38	RB1CC1	RGS5	RNF216	RPS19	S1PR2	SCNN1A	SERPINA1	SH2D1A
PNOC	POT1	PRF1	PRRG1	PTPN12	RAB39B	RBBP8	RGS6	RNF31	RPS20	SAA1	SCNN1B	SERPINA2	SH3BP2
PNP	POU1F1	PRG4	PRRG3	PTPN14	RAB3GAP1	RBCK1	RGS7	RNF43	RPS24	SACS	SCNN1G	SERPINA3	SH3D19
PNPLA1	POU2AF1	PRICKLE1	PRRT2	PTPN18	RAB3GAP2	RBM10	RGS9	RNF6	RPS26	SAG	SCO1	SERPINA5	SH3PXD2B
PNPLA2	POU3F4	PRICKLE2	PRRX1	PTPN2	RAB40AL	RBM15	RGS9BP	RNF7	RPS27	SALL1	SCO2	SERPINA6	SH3TC2
PNPLA6	POU4F3	PRICKLE3	PRRX2	PTPN21	RAB7A	RBM20	RHAG	RNLS	RPS28	SALL2	SCP2	SERPINA7	SHANK1
PNPLA8	POU6F2	PRIMPOL	PRSS1	PTPN22	RABGGTA	RBM28	RHBDF2	RNPC3	RPS29	SALL4	SCPEP1	SERPINB6	SHANK2
PNPO	PPA2	PRKACA	PRSS12	PTPN23	RABL6	RBM47	RHCE	RNU4ATAC	RPS6KA3	SAMD9	SCRIB	SERPINB7	SHANK3
PNPT1	PPARA	PRKACG	PRSS56	PTPN3	RAC1	RBM8A	RHD	ROB2	RPS7	SAMD9L	SCYL1	SERPINB8	SHBG
POC1A	PPARD	PRKAG2	PRTN3	PTPRC	RAC2	RBP3	RHO	ROB3	RPSA	SAMHD1	SDC3	SERPINC1	SHH
POC1B	PPARG	PRKAR1A	PRX	PTPRD	RAD21	RBP4	RHOD	ROGDI	RRAS	SAR1B	SDCCAG8	SERPIND1	SHOC2
PODXL	PPARGC1A	PRKAR1B	PSAP	PTPRF	RAD50	RBPJ	RHOH	ROM1	RRAS2	SARDH	SDHA	SERPINE1	SHOX
POF1B	PPARGC1B	PRKCD	PSAT1	PTPRO	RAD51	RCBTB1	RIMS1	ROR2	RRM1	SARS1	SDHAF1	SERPINF1	SHOX2
POFUT1	PPIB	PRKCG	PSEN1	PTPRQ	RAD51	RCC1L	RIN2	RORA	RRM2B	SARS2	SDHAF2	SERPINF2	SHPK
POGLUT1	PPM1B	PRKCH	PSEN2	PTPRR	RAD51B	RD3	RINT1	RORC	RS1	SASH1	SDHB	SERPING1	SHROOM2
POGZ	PPM1D	PRKCSH	PSENE1	PTPRU	RAD51C	RDH11	RIPK2	ROS1	RSC1A1	SASS6	SDHC	SERPINH1	SHROOM3
POLA1	PPM1K	PRKD1	PSMA3	PTPRZ1	RAD51D	RDH12	RIPK4	RP1	RSPH1	SAT1	SDHD	SERPINI1	SHROOM4

SI	SLC19A1	SLC25A20	SLC28A3	SLC4A11	SLC04C1	SNAI2	SPARC	SRXN1	STT3A	SYNE4	TBC1D20	TCN1	TGFB3
SIAE	SLC19A2	SLC25A21	SLC29A1	SLC4A4	SLC05A1	SNAP25	SPART	SRY	STT3B	SYNGAP1	TBC1D24	TCN2	TGFB1
SIGMAR1	SLC19A3	SLC25A22	SLC29A2	SLC4A7	SLC06A1	SNAP29	SPAST	SS18	STUB1	SYNJ1	TBC1D32	TCOF1	TGFBR1
SIK1	SLC1A1	SLC25A23	SLC29A3	SLC52A1	SLFN14	SNCA	SPATA16	SS18L1	STX11	SYNJ2	TBC1D4	TCP10L2	TGFBR2
SIL1	SLC1A3	SLC25A24	SLC2A1	SLC52A2	SLIT2	SNCAIP	SPATA5	SSR4	STX16	SYNM	TBC1D7	TCTEX1D2	TGFBR3
SIM1	SLC1A4	SLC25A25	SLC2A10	SLC52A3	SLITRK1	SNCB	SPATA7	SSX1	STX1A	SYNPO	TBC1D8B	TCTN1	TGFBRAP1
SIPA1L3	SLC20A2	SLC25A26	SLC2A2	SLC5A1	SLITRK6	SNIP1	SPECC1L	SSX2	STX1B	SYP	TBCD	TCTN2	TGIF1
SIRT3	SLC22A1	SLC25A27	SLC2A3	SLC5A2	SLMAP	SNRNP200	SPEF2	ST14	STX3	SYT1	TBCE	TCTN3	TGM1
SIX1	SLC22A10	SLC25A28	SLC2A4	SLC5A5	SLTM	SNRPB	SPEG	ST3GAL3	STXBP1	SYT14	TBCK	TDGF1	TGM3
SIX2	SLC22A11	SLC25A29	SLC2A5	SLC5A6	SLURP1	SNRPE	SPG11	ST3GAL4	STXBP2	SYT2	TBK1	TDO2	TGM5
SIX3	SLC22A12	SLC25A3	SLC2A6	SLC5A7	SLX4	SNRPN	SPG21	ST3GAL5	SUCLA2	SYTL2	TBL1X	TDP1	TGM6
SIX5	SLC22A13	SLC25A30	SLC2A9	SLC6A1	SMAD2	SNTA1	SPG7	ST6GAL2	SUCLG1	SYTL4	TBL1XR1	TDP2	TH
SIX6	SLC22A14	SLC25A31	SLC30A10	SLC6A14	SMAD3	SNTG1	SPIB	STAB2	SUCLG2	SYTL5	TBL2	TDRD7	THAP1
SKI	SLC22A15	SLC25A32	SLC30A2	SLC6A17	SMAD4	SNX10	SPINK1	STAC3	SUFU	SZT2	TBP	TEAD1	THBD
SKIV2L	SLC22A16	SLC25A33	SLC30A4	SLC6A18	SMAD6	SNX14	SPINK5	STAG1	SUGCT	TAB2	TBR1	TECPR2	THBS1
SLC10A1	SLC22A17	SLC25A34	SLC30A8	SLC6A19	SMAD7	SNX3	SPINT2	STAG3	SULF1	TAC3	TBX1	TECR	THBS2
SLC10A2	SLC22A18	SLC25A35	SLC31A1	SLC6A2	SMAD9	SNX31	SPOP	STAMBP	SULT1A1	TACC1	TBX10	TECTA	THG1L
SLC11A1	SLC22A18AS	SLC25A36	SLC33A1	SLC6A20	SMARCA2	SOAT1	SPP1	STAR	SULT1A2	TACC3	TBX15	TEK	THOC2
SLC11A2	SLC22A2	SLC25A37	SLC34A1	SLC6A3	SMARCA4	SOBP	SPR	STARD3	SULT1A3	TACO1	TBX18	TELO2	THOC6
SLC12A1	SLC22A3	SLC25A38	SLC34A2	SLC6A4	SMARCA5	SOD1	SPRED1	STARD4	SULT1B1	TACR1	TBX19	TENM1	THPO
SLC12A2	SLC22A4	SLC25A39	SLC34A3	SLC6A5	SMARCAD1	SOD2	SPRTN	STARD8	SULT1C2	TACR3	TBX2	TENM3	THRA
SLC12A3	SLC22A5	SLC25A4	SLC35A1	SLC6A6	SMARCAL1	SOD3	SPRY1	STAT1	SULT1C4	TACSTD2	TBX20	TENM4	THRB
SLC12A5	SLC22A6	SLC25A40	SLC35A2	SLC6A8	SMARCB1	SOHLH1	SPRY2	STAT2	SULT1E1	TAF1	TBX21	TEPSIN	THUMPD1
SLC12A6	SLC22A7	SLC25A41	SLC35A3	SLC6A9	SMARCC1	SON	SPRY3	STAT3	SULT2A1	TAF15	TBX22	TERC	TIA1
SLC12A7	SLC22A8	SLC25A42	SLC35C1	SLC7A14	SMARCC2	SORD	SPRY4	STAT4	SULT2B1	TAF2	TBX3	TERF2IP	TICAM1
SLC13A1	SLC22A9	SLC25A43	SLC35D1	SLC7A5	SMARCD1	SORL1	SPTA1	STAT5A	SULT4A1	TAF4B	TBX4	TERT	TIMM44
SLC13A2	SLC23A1	SLC25A44	SLC36A2	SLC7A7	SMARCD2	SORT1	SPTAN1	STAT5B	SUMF1	TAF7L	TBX5	TET2	TIMM8A
SLC13A3	SLC23A2	SLC25A45	SLC37A1	SLC7A8	SMARCD3	SOS1	SPTB	STAT6	SUMO1	TAFAZZIN	TBX6	TEX11	TIMP1
SLC13A5	SLC24A1	SLC25A46	SLC37A4	SLC7A9	SMARCE1	SOS2	SPTBN2	STEAP3	SUMO4	TAL1	TBXA2R	TEX28	TIMP3
SLC14A1	SLC24A4	SLC25A5	SLC38A1	SLC8B1	SMC1A	SOST	SPTLC1	STIL	SUN1	TAL2	TBXAS1	TF	TINAGL1
SLC15A1	SLC24A5	SLC25A53	SLC38A8	SLC9A1	SMC3	SOX10	SPTLC2	STIM1	SUN5	TALDO1	TBXT	TFAP2A	TINF2
SLC15A2	SLC25A1	SLC25A6	SLC39A13	SLC9A3	SMCHD1	SOX11	SQSTM1	STIM2	SUOX	TANC2	TCAP	TFAP2B	TIRAP
SLC16A1	SLC25A10	SLC26A2	SLC39A14	SLC9A3R1	SMG9	SOX17	SRC	STING1	SURF1	TANGO2	TCEAL3	TFB1M	TJP1
SLC16A12	SLC25A11	SLC26A3	SLC39A4	SLC9A6	SMIM1	SOX18	SRCAP	STK11	SUZ12	TAP1	TCF12	TFE3	TJP2
SLC16A2	SLC25A12	SLC26A4	SLC39A5	SLC9A9	SMN1	SOX2	SRD5A2	STK19	SVBP	TAP2	TCF20	TFEB	TK2
SLC16A9	SLC25A13	SLC26A5	SLC39A8	SLC01A2	SMN2	SOX3	SRD5A3	STK4	SYCE1	TAPBP	TCF21	TFG	TKT
SLC17A3	SLC25A14	SLC26A8	SLC3A1	SLC01B1	SMO	SOX5	SREBF1	STN1	SYCP2	TAPT1	TCF3	TFR2	TKTL1
SLC17A5	SLC25A15	SLC26A9	SLC40A1	SLC01B3	SMOC1	SOX9	SREBF2	STOM	SYCP3	TARDBP	TCF4	TFRC	TLE6
SLC17A8	SLC25A16	SLC27A1	SLC41A1	SLC01C1	SMOC2	SP110	SRGAP1	STOX1	SYN1	TARS2	TCF7L1	TG	TLL1
SLC17A9	SLC25A17	SLC27A4	SLC45A2	SLC02A1	SMOX	SP7	SRGAP3	STRA6	SYN2	TAS2R16	TCF7L2	TGDS	TLR1
SLC18A1	SLC25A18	SLC27A5	SLC46A1	SLC02B1	SMPD1	SPAG1	SRP72	STRADA	SYNCRIP	TAS2R38	TCHH	TGFA	TLR2
SLC18A2	SLC25A19	SLC28A1	SLC46A3	SLC03A1	SMPX	SPAG17	SRPX2	STRC	SYNE1	TAT	TCIRG1	TGFB1	TLR3
SLC18A3	SLC25A2	SLC28A2	SLC4A1	SLC04A1	SMS	SPAG6	SRRT	STS	SYNE2	TBC1D1	TCL1A	TGFB2	TLR4

TLR5	TMPO	TNPO2	TRAPPC14	TRPC6	TTC37	TWSG1	UGT1A10	UQCR10	VAX1	WAC	WNT7A	ZBTB20	ZMYND15
TLR8	TMPRSS15	TNPO3	TRAPPC2	TRPM1	TTC7A	TXN2	UGT1A3	UQCR11	VCAN	WARS2	WRAP53	ZBTB24	ZNF141
TLX1	TMPRSS3	TNR	TRAPPC9	TRPM3	TTC8	TXNIP	UGT1A4	UQCRB	VCL	WAS	WRN	ZBTB40	ZNF148
TLX3	TMPRSS4	TNXB	TRDN	TRPM4	TTF1	TXNL4A	UGT1A5	UQCRC1	VCP	WASHC4	WT1	ZBTB42	ZNF197
TM4SF20	TMPRSS5	TOMM34	TREH	TRPM6	TTF2	TXNRD2	UGT1A6	UQCRC2	VDAC1	WASHC5	WWC1	ZC3H14	ZNF335
TMC1	TMPRSS6	TOP2A	TREM2	TRPM7	TTI2	TYK2	UGT1A7	UQCRFS1	VDR	WDPCP	WWC3	ZC4H2	ZNF365
TMC6	TMTC3	TOPORS	TREX1	TRPS1	TTLL10	TYMP	UGT1A8	UQCRH	VEGFA	WDR1	WVOX	ZCCHC12	ZNF408
TMC8	TMX3	TOR1A	TREX2	TRPV3	TTLL5	TYMS	UGT1A9	UQCRQ	VEGFC	WDR11	WWTR1	ZCCHC8	ZNF41
TMCO1	TNC	TOR1AIP1	TRH	TRPV4	TTN	TYR	UGT2A1	UROC1	VHL	WDR13	XBP1	ZDHHHC15	ZNF423
TMEM107	TNF	TOX4	TRHR	TSC1	TTPA	TYROBP	UGT2B10	UROD	VIM	WDR19	XDH	ZDHHHC9	ZNF425
TMEM114	TNFAIP3	TP53	TRIAP1	TSC2	TTR	TYRP1	UGT2B11	UROS	VIP	WDR27	XIAP	ZEB1	ZNF469
TMEM126A	TNFRSF10B	TP63	TRIM2	TSC22D3	TUB	UBA1	UGT2B15	USB1	VIPAS39	WDR35	XIST	ZEB2	ZNF513
TMEM126B	TNFRSF11A	TP73	TRIM24	TSEN15	TUBA1A	UBA2	UGT2B17	USF1	VKORC1	WDR36	XK	ZFAT	ZNF526
TMEM127	TNFRSF11B	TPC2	TRIM27	TSEN2	TUBA4A	UBA5	UGT2B28	USF2	VLDLR	WDR45	XKRX	ZFHX3	ZNF592
TMEM132E	TNFRSF13B	TPH2	TRIM32	TSEN34	TUBA8	UBAC2	UGT2B4	USH1C	VMA21	WDR45B	XPA	ZFHX4	ZNF599
TMEM135	TNFRSF13C	TPI1	TRIM33	TSEN54	TUBAL3	UBB	UGT2B7	USH1G	VNN2	WDR48	XPC	ZFP57	ZNF644
TMEM138	TNFRSF1A	TPK1	TRIM37	TSFM	TUBB	UBE2A	UGT8	USH2A	VPS11	WDR62	XPNPEP2	ZFPM2	ZNF674
TMEM165	TNFRSF1B	TPM1	TRIM44	TSG101	TUBB1	UBE2T	UMOD	USP18	VPS13A	WDR72	XPNPEP3	ZFR	ZNF687
TMEM185A	TNFRSF4	TPM2	TRIM54	TSHB	TUBB2A	UBE3A	UMPS	USP27X	VPS13B	WDR73	XPR1	ZFTA	ZNF711
TMEM186	TNFSF11	TPM3	TRIM63	TSHR	TUBB2B	UBE3B	UNC119	USP8	VPS13C	WDR81	XRCC2	ZFX	ZNF713
TMEM199	TNFSF12	TPM4	TRIO	TSHZ1	TUBB3	UBIAD1	UNC13A	USP9X	VPS33A	WFS1	XRCC3	ZFYVE26	ZNF750
TMEM216	TNFSF15	TPMT	TRIOBP	TSHZ3	TUBB4A	UBQLN2	UNC13B	UTP14A	VPS33B	WHRN	XRCC4	ZFYVE27	ZNF778
TMEM231	TNFSF4	TPO	TRIP11	TSPAN12	TUBB8	UBR1	UNC13D	UTP4	VPS35	WIF1	XYLT1	ZIC1	ZNF81
TMEM237	TNIK	TPP1	TRIP4	TSPAN7	TUBG1	UBR4	UNC45B	UTRN	VPS37A	WIPF1	XYLT2	ZIC2	ZP1
TMEM240	TNK2	TPP2	TRIT1	TSPEAR	TUBGCP4	UBR7	UNC80	UVRAG	VPS45	WNK1	YAP1	ZIC3	ZSWIM6
TMEM26	TNKS2	TPRN	TRMT1	TSPO	TUBGCP6	UBTF	UNC93B1	UVSSA	VPS53	WNK3	YARS1	ZIC4	
TMEM38B	TNNC1	TRAC	TRMT10A	TSPOAP1	TUFM	UCHL1	UNG	VAC14	VPS54	WNK4	YARS2	ZIC5	
TMEM43	TNNI2	TRAF3	TRMT10C	TSPYL1	TUFT1	UCN	UPB1	VAMP1	VRK1	WNT1	YME1L1	ZIM2	
TMEM67	TNNI3	TRAF3IP1	TRMT2B	TSR2	TULP1	UCP1	UPF3B	VAMP7	VSIG2	WNT10A	YWHAE	ZMPSTE24	
TMEM70	TNNI3K	TRAF3IP2	TRMT5	TTBK2	TUSC3	UCP2	UPK2	VANGL1	VSNL1	WNT10B	YY1	ZMYM3	
TMEM98	TNNT1	TRAF6	TRMU	TTC12	TWF1	UCP3	UPK3A	VANGL2	VSX1	WNT3	ZAP70	ZMYM6	
TMIE	TNNT2	TRAIIP	TRNT1	TTC19	TWIST1	UFD1	UQCC1	VAPB	VSX2	WNT3A	ZBBX	ZMYND10	
TMLHE	TNNT3	TRAP1	TRPA1	TTC21B	TWIST2	UFSP2	UQCC2	VARS1	VVA3B	WNT4	ZBTB16	ZMYND11	
TMOD1	TNPO1	TRAPPC11	TRPC3	TTC25	TWNK	UGT1A1	UQCC3	VARS2	VWF	WNT5A	ZBTB18	ZMYND12	