

Álvaro Roberto Gonçalves Serrado

As Técnicas de Genética Molecular na Investigação e Diagnóstico em Bioquímica
Clínica

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2017

Álvaro Roberto Gonçalves Serrado

As Técnicas de Genética Molecular na Investigação e Diagnóstico em Bioquímica
Clínica

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2017

© 2017
Álvaro Roberto Gonçalves Serrado
TODOS OS DIREITOS RESERVADOS

Álvaro Roberto Gonçalves Serrado

As Técnicas de Genética Molecular na Investigação e Diagnóstico em Bioquímica
Clínica

Álvaro Roberto Gonçalves Serrado

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob a orientação do Prof. Doutor José Manuel Cabeda.

Resumo

Os erros hereditários do metabolismo, são responsáveis por um conjunto alargado de doenças. Este tipo de doenças é raro, o que leva a que haja poucos indivíduos para estudo, tornando a investigação e diagnóstico deste tipo de doenças árduo. Com a associação destas doenças a erros no DNA, a comunidade científica iniciou a utilização de técnicas de genética molecular para estas tarefas, tornando o diagnóstico assim como a investigação mais fácil e rápida.

O uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) cujo objetivo é a amplificação de sequências específicas de ácidos nucleicos, consegue identificar a presença ou não de uma determinada mutação num indivíduo o que é muito útil para o diagnóstico das doenças metabólicas. Evoluções nesta técnica conseguiram acentuar ainda mais a importância das técnicas de genética molecular no diagnóstico em medicina. Outra tecnologia genética muito importante nas doenças metabólicas é a sequenciação de ácidos nucleicos. Com efeito, a capacidade de ler a sequência de genomas inteiros ou parciais, revolucionou a genética e o seu uso, como ferramenta de investigação e diagnóstico. As maiores desvantagens da sequenciação são os custos associados, e a necessidade de realizar o pós-processamento de um elevado volume de dados. Contudo, espera-se que futuros desenvolvimentos tornem estas tecnologias ainda mais fáceis de interpretar e mais acessíveis à comunidade, maximizando o seu potencial para o diagnóstico assim como o seu poder na identificação de novas mutações responsáveis por doenças.

É importante referir como estas tecnologias funcionam, assim como a maneira como estas podem ajudar nas doenças hereditárias do metabolismo. Com este trabalho espera-se dar ao leitor uma visão alargada das diferentes técnicas de genética molecular disponíveis atualmente, como funcionam, vantagens e desvantagens, e demonstrar com exemplos práticos o quão vantajosas podem ser estas tecnologias nesta área da medicina.

Palavras-chave: PCR, Sequenciação, Erros Hereditários do Metabolismo, Diagnóstico molecular, Investigação genética, Mutação, Análise do DNA.

Abstract

Inborn errors of metabolism are responsible for a large number of diseases. This type of diseases is rare, resulting in few individuals for study, which makes investigation and diagnosis of this type of diseases hard. The association of these diseases to DNA errors has led the scientific community to use molecular genetic technologies for their diagnosis and investigation making its study easier and quicker.

The use of the polymerase chain reaction (PCR) and its derivatives, for the amplification of specific DNA sequences leads to the identification of the presence or absence of a certain mutation in an individual which is highly useful for the diagnosis of metabolic diseases. Evolutions of these techniques have managed to make the molecular genetics a staple on the laboratory diagnostics in medicine. Another essential genetic technique for the diagnosis of metabolic diseases is sequencing. In fact, the ability to read fully or in part an individual's genome has revolutionized genetics and its use as an investigation and diagnostic tool. The major disadvantages of sequencing are its associated cost, and the need for the post-processing of the high volume of data collected. In spite of that, future developments are expected to make these technologies easier to use and more accessible to the community, maximizing their power for the diagnosis and for the identification of new disease causing mutations.

It is important to refer how these technologies work, as well as how they can help study and detect inborn errors of metabolism. With the present work we expected to give the reader an overview of the different molecular genetics techniques available nowadays, explaining how they work, it's associated advantages and disadvantages, and to show, with practical examples, how advantageous can these technologies be in this area of medicine.

Keywords: PCR, Sequencing, Inborn errors of metabolism, Molecular Diagnostics, Genetic investigation, mutation, DNA analysis.

Dedicatória

“... e foi então que fiz a maior descoberta da minha carreira, a maior descoberta da minha vida. É apenas nas misteriosas equações do amor que reside qualquer lógica ou razão.”

(John Nash)

Às Pessoas mais importantes da minha vida,

Devido ao amor e carinho que me deram

Por fazerem de mim quem sou

A vós dedico...

Agradecimentos

Quero em primeiro lugar agradecer à Universidade Fernando Pessoa pela qualidade de ensino que me proporcionou e por estes 5 anos que nunca esquecerei.

A Todos os que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho, eu vos agradeço.

Ao meu orientador Prof. Doutor José Cabeda quero dar um agradecimento especial, por todo o apoio incondicional, motivação, disponibilidade e paciência constantes durante a realização deste trabalho. Pela palavra e atitude certa no momento certo, pelas opiniões e críticas construtivas que tornam este trabalho tão dele como meu.

Aos meus colegas de Faculdade quero deixar o meu profundo agradecimento: Tiago, Beatriz, Micaela, Patrícia, Daniela, Andreia e Gil ... que o mundo vos sorria como vocês sempre me conseguiram fazer sorrir. A Irmandade será algo que levarei na memória e digo-vos.... Fomos uma equipa daquelas. O melhor do mundo a nós!

Quero agradecer ao meu irmão Hugo e à Elisabete por todo o apoio incondicional e por porem um verdadeiro anjinho neste planeta cujo simples sorriso e abraço é capaz de completamente colapsar toda e qualquer preocupação, fazendo dele, o centro do meu mundo... Gabriel, as coisas podem mudar, mas estarei aqui presente para tomar conta de ti e ver-te crescer ... para sempre...

À minha mãe pelo apoio, gestos e palavras que me moldaram na pessoa que eu sou hoje. Ao meu pai por todo o sacrifício que fez e faz até hoje para que eu pudesse desenvolver os meus estudos, tudo para que um dia eu não tenha de fazer o mesmo sacrifício que ele. A vós meus pais por tudo aquilo que eu escrevi e não escrevi aqui por sempre acreditarem em mim, vos agradeço.

Por último, e mais importante... um obrigado a ti Gisela, agradeço-te porque, sejamos sinceros, só sou o que sou hoje graças ti, és a razão de eu ser... és todas as minhas razões.... Obrigado...

ÍNDICE GERAL

Resumo	VI
Abstract	VII
Dedicatória	VIII
Agradecimentos	IX
Índice de Figuras	VIII
Lista de Abreviaturas	IX
1. Introdução	1
2. Técnicas de Análise Genética	5
2.1. PCR – Reação em Cadeia da Polimerase	5
2.1.1. PCR Convencional	5
2.1.2. PCR Multiplex	15
2.1.3. ARMS-PCR	16
2.1.4. RT-PCR	18
2.1.5. PCR em Tempo Real (qPCR)	19
2.1.6. PCR Digital	24
2.2. Diagnóstico com Sequenciação	28
3. Bioquímica	33
3.1. Conceitos de Hereditariedade e Mutações	33
3.2. Doenças de Causalidade Metabólica	37
3.2.1. Doença de Gaucher (DG)	37
3.2.2. Deficiência em Adenosina Monofosfato Desaminase 1 Muscular	42
3.2.3. Deficiência de Glicosiltransferase 1 (ALG6-CDG)	44
3.2.4. Doença do armazenamento do glicogénio tipo 0	46
3.2.5. Desordens da Fosforilação Oxidativa	49
4. Conclusão	56
5. Bibliografia	58

Índice de Figuras

Figura 1 – Demonstração da variação da temperatura e as 3 fases da PCR.....	8
Figura 2 – Processo de formação de primer-dimers.....	11
Figura 3 – Demonstração esquemática do ARMS PCR.....	21
Figura 4 – Reação de RT-PCR.....	22
Figura 5 – Representação gráfica do funcionamento do SYBR green I.....	24
Figura 6 – Demonstração do processo de qPCR.....	26
Figura 7 – Análise da temperatura de fusão.....	26
Figura 8 – Tipos de métodos para a deteção direta de produto em PCR.....	27
Figura 9 – Demonstração do funcionamento do ddPCR.....	30
Figura 10 – Sequenciação por nanoporos.....	35
Figura 11 – Esquema das diferentes formas da transmissão das doenças.....	38
Figura 12 – Métodos para a identificação de mutações causadoras de doença ...	39
Figura 13 – Estudo das doenças hereditárias do metabolismo.....	40
Figura 14 – Via metabólica dos esfingolípidos.....	41
Figura 15 – Radiografia aos joelhos de um paciente com doença de Gaucher ...	42
Figura 16 – Célula de Gaucher.....	45
Figura 17 – O ciclo das purinas e a adenilato quinase.....	46
Figura 18 – Processo da N-glicosilação.....	48
Figura 19 – Mecanismo de armazenamento da glicose.....	50
Figura 20 – Processo de OXPHOS.....	54
Figura 21 – Mutações nucleares que causam distúrbios da OXPHOS.....	58

Lista de Abreviaturas

ALG6-CDG - Desordem congênita da glicosilação no gene ALG6 (do Inglês: *ALG6 – congenital disorder of glycosylation*)

AMPD1 – Adenosina monofosfato desaminase 1 (do Inglês: *Adenosine monophosphate desaminase 1*)

ARMS-PCR – Sistema de Amplificação Refratário de Mutações da reação das polimerases em cadeia (do Inglês: *Amplification refractory mutation system of the polymerase chain reaction*)

cDNA - DNA Complementar (do Inglês: *Complementary DNA*)

ddPCR – PCR Digital em Gotículas (do Inglês: *Droplet digital PCR*)

DG – Doença de Gaucher

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do Inglês: *Deoxyribonucleic acid*)

ssDNA – Ácido desoxirribonucleico de cadeia única (do Inglês: *Single strand deoxyribonucleic acid*)

DNTP's – Desoxinucleótidos Trifosfatados (do Inglês: *Deoxynucleotide triphosphate*)

dPCR – PCR Digital (do Inglês: *Digital PCR*)

dsDNA – Ácido desoxirribonucleico de cadeia dupla (do Inglês: *Double stranded deoxyribonucleic acid*)

GS – Glicogénio Sintetase

GSD – Doença do Armazenamento do Glicogénio (do inglês: *Glycogen storage disease*)

LHON – Neuropatia ótica hereditária de Leber (do Inglês: *Leber hereditary optic neuropathy*)

MELAS – Encefalopatia mitocondrial com acidose láctica e episódios de convulsões (do Inglês: *Mitochondrial encephalopathy lactic acidosis stroke-like episodes*)

MERRF – epilepsia mioclônica com fibras vermelhas esfarrapadas (do Inglês: *Myoclonic epilepsy with ragged red fibers*)

mtDNA – Ácido desoxirribonucleico mitocondrial (do Inglês: *Mitochondrial deoxyribonucleic acid*)

PCR – Reação da Polimerase em Cadeia (do Inglês: *Polymerase chain reaction*)

qPCR – PCR em Tempo Real (do Inglês: *Quantitative PCR*)

RT-PCR – PCR de transcrição reversa (do Inglês: *Reverse transcription PCR*)

SMRT - Sequenciação de molécula única de DNA em tempo real (do Inglês: *Single molecule real time DNA sequencing*)

Tm – Temperatura de Fusão (do Inglês: *Melting temperature*)

tRNA – Ácido ribonucleico de transferência (do Inglês: *Transfer ribonucleic acid*)

OXPHOS – Fosforilação oxidativa (do Inglês: *Oxidative phosphorylation*)

WES – Sequenciação completa do exoma (do Inglês: *Whole exome sequencing*)

WGS – Sequenciação completa do genoma (do Inglês: *Whole genome sequencing*)

1. Introdução

Os estudos da Genética têm vindo a ser alvo de um elevado interesse pela medicina desde o séc. XX, principalmente quando se descobriu que este pode ser um fator importante no aparecimento de doenças transmissíveis para a descendência. Imensos estudos e técnicas pioneiras impulsionaram a indústria baseada em tecnologia molecular, com aplicações em diferentes áreas, desde o desenvolvimento de alimentos transgénicos, a possíveis vacinas de DNA (Turnpenny e Ellard, 2007). O primeiro impulso da genética ocorreu no ano de 1900, altura em que foram confirmados o conceito de hereditariedade e as Leis de Mendel, sendo que estas podem afetar qualquer parte e função do corpo humano, dos quais alguns distúrbios são mais frequentes e outros mais graves. No ano de 1908, Archibald Garrod (1858-1936) foi o primeiro a referir que algumas doenças genéticas podem originar enzimas defeituosas, tendo agrupado esta categoria de doenças como “erros inatos do metabolismo” (Pasternak, 2002). Após o ano de 1900 a área da genética sofreu dois grandes impulsos: o desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR) e o Projeto do Genoma Humano. A PCR foi desenvolvida por Kary Mullis na década de 80 e, devido à sua simplicidade tornou-se uma ferramenta essencial no trabalho com ácidos nucleicos (Kennedy e Oswald, 2011). O Projeto do Genoma Humano que se iniciou em 1990 e durou até 2004 teve como função sequenciar o genoma humano por completo. Estes dados permitiram um melhor entendimento da informação genética e conduziu a novas técnicas de diagnóstico, que continuam a ser aplicadas e desenvolvidas nos dias de hoje, assim como a um melhor aconselhamento para famílias com doenças genéticas (Turnpenny e Ellard, 2007).

Desde a sua descoberta no ano de 1983, a PCR tornou-se das técnicas mais usadas da biologia molecular (Bartlett e Stirling, 2003). Consiste no uso de uma pequena amostra

de Ácido desoxirribonucleico (DNA) e inseri-la num cocktail de compostos que é exposto a ciclos de temperatura, de maneira a que sejam criadas novas moléculas iguais à da amostra original. É um processo que na altura tinha de ser muito controlado, otimizado, e que exigia no final o uso de eletroforese em gel para de facto se observarem os resultados (Mcpherson e Møller, 2006). Devido a novos avanços foram desenvolvidas outras técnicas baseadas na PCR original como por exemplo: com a PCR em tempo real (qPCR) já não é necessário o uso de eletroforese; com a PCR multiplex, é possível amplificar vários alvos (Henegariu *et al.*, 1997; Meuer *et al.*, 2001). Estas técnicas, entre outras, tornaram a PCR uma das principais ferramentas não só de amplificação de DNA mas como também no diagnóstico genético devido à sua rapidez, sensibilidade e especificidade sem paralelo (Post e Ehrlich, 2000).

As doenças do metabolismo têm causa genética, e são conhecidos mais de 200 erros do metabolismo que podem afetar o metabolito, a via metabólica, a função da enzima e organelo celular envolvido. São doenças raras, transmitidas verticalmente de indivíduo para indivíduo. São normalmente autossómicas recessivas ou ligadas ao cromossoma X, sendo raramente doenças dominantes (Turnpenny e Ellard, 2007).

Os ensaios normalmente usados para diagnosticar estas doenças são testes enzimáticos que se subdividem em 3 fases (Loit *et al.*, 2011): a fase pré-analítica, a fase analítica e a pós-analítica. Todas estas fases têm associado um controlo de qualidade necessário para obter os melhores resultados possíveis. A fase analítica, apresenta uma complicação no que toca à padronização, calibração e avaliação dos resultados obtidos devido à falta de materiais de referência e ao uso de métodos e reagentes diferentes, sendo até recomendável a cada laboratório ter os seus próprios valores de referência. Outros testes, como a espectrometria de massa, são também usados, contudo laboratórios com

este equipamento não estão disponíveis para todo o mundo devido ao seu preço elevado, e são mais testes de rastreio do que propriamente diagnóstico (Millington, 2008). Devido a isso o uso de testes genéticos são necessários para um diagnóstico definitivo, visto que os testes de rastreio apenas conseguem identificar famílias que estejam em risco de apresentar um erro do metabolismo hereditário e não conseguem dar um diagnóstico definitivo (Elshaari *et al.*, 2013). Novos ensaios, como a PCR digital, descrito pela primeira vez em 1999 permitem com maior eficácia, sensibilidade, precisão e com menor custo, identificar mutações, embora outros testes também possam ser usados. Com muitas outras aplicações esta técnica tem sido muito procurada e funciona separando os resultados da PCR em tempo real e usando sondas com flurocromos de cores diferentes tornando a identificação de sequências mais fácil e mais rápida (Bizouarn, 2004).

Outras técnicas de biologia molecular que sofreram também várias evoluções desde a sua criação foram as técnicas de sequenciação de ácidos nucleicos. Estes tipos de ensaios diferem da PCR devido ao facto de terem metodologias e objetivos completamente diferentes. Um amplifica DNA ou RNA, recorrendo à reação em cadeia das polimerases de Transcrição Reversa (RT-PCR- *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) e a outra tem como função mostrar as sequências que compõem os diferentes genes do organismo, o que em tempos era um processo complicado e demorado. Contudo novas tecnologias tornaram este processo muito mais simples, rápido e economicamente viável (Morrison *et al.*, 2015). Com evoluções neste campo será possível desenvolver novos esquemas de avaliação de diagnóstico em muitas doenças (Boyd, 2013).

Com o presente trabalho procurou-se descrever as diferentes técnicas de Genética Molecular atualmente disponíveis para o estudo das mutações, realçando o seu

mecanismo molecular de funcionamento, respetivas vantagens e inconvenientes no estudo e diagnóstico de doenças metabólicas. Procuramos também ilustrar a utilização destas técnicas, descrevendo algumas doenças metabólicas a nível molecular e fisiopatológico e relatando a utilização das técnicas de Genética Molecular para o diagnóstico e descobertas de novas mutações causadoras destas doenças.

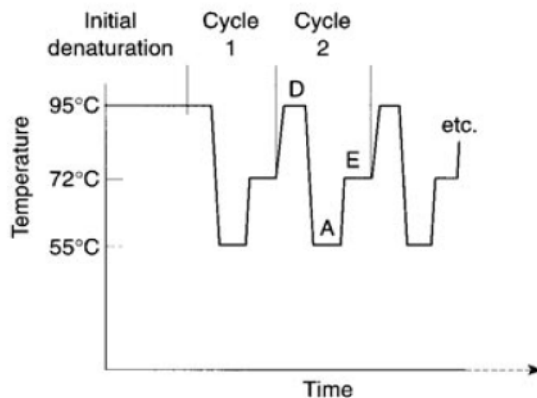
Para a realização deste trabalho, foram procurados artigos em Bases de Dados como a Pubmed, Sciencedirect e B-on utilizando as seguintes palavras chave: PCR, erros hereditários do metabolismo, mutações, investigação genética, diagnóstico molecular, sequenciação, diagnóstico genético, doenças metabólicas. Dos artigos encontrados foram selecionados os artigos publicados entre 2015 e 2017, sem prejuízo da citação dos artigos originais para técnicas ou patologias descritas antes destas datas. Foram ainda utilizados como fonte de informação livros disponíveis na biblioteca da UFP, na biblioteca pessoal do autor ou na biblioteca pessoal do orientador.

2. Técnicas de Análise Genética

2.1. PCR – *Reação em Cadeia da Polimerase*

2.1.1. PCR Convencional

Desenvolvida em 1983 por Kary Mullis, a PCR tornou-se das ferramentas mais usadas da biologia molecular (Bartlett e Stirling, 2003). A técnica tem como objetivo produzir várias cópias de DNA a partir de uma



amostra com baixa concentração deste ácido nucleico (Mcpherson e Møller, 2006). Para isto a reação consiste em colocar uma amostra de DNA num “cocktail” de meio com

Figura 1 - Demonstração da variação da temperatura ao longo de dois ciclos de PCR mostrando as 3 fases: desnaturação (**D**) que ocorre aos 95°C. Neste passo a molécula de DNA desnatura, separando-se. *Annealing* (**A**) ocorre a uma temperatura mais baixa, permite a ligação dos primers à amostra de PCR. Extensão (**E**) que ocorre a uma temperatura otimizada para o funcionamento da Polimerase, que neste caso são 72°C (Joshi e Deshpande, 2010).

desóxinucleótidos trifosfatados (DNTP's), enzimas, e com dois oligonucleótidos de 18 a 23 pares de base de comprimento denominados de “*primers*”, sendo esse cocktail sujeito a ciclos de temperatura (Fig. 1). Os primers são criados com base na informação da sequência de DNA e respetiva Temperatura de fusão (T_m) (Bartlett e Stirling, 2003). Os primers são então complementares com uma cadeia de DNA simples quer a paralela ou antiparalela e, devido a isso, estabelecem ligação com facilidade sendo a correta hibridização o fator determinante na especificidade do processo (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). O uso da temperatura permite desnaturar (a primeira fase da PCR) uma cadeia de

DNA, tornando-a em 2 cadeias de DNA simples. A temperatura é reduzida e permite o “*annealing*” (a segunda fase da PCR) em que os *Primers* se ligam por complementaridade às cadeias de DNA simples. Finalmente a temperatura sobe mais uma vez e permite que a enzima DNA polimerase funcione e temos então a última fase da PCR (extensão) de que resultam duas novas cadeias de DNA iguais ao original. Este processo é realizado em ciclos e otimizado para que dele resulte um aumento da concentração de DNA, o mais fidedigno possível, comparado com a quantidade inicial (Bartlett e Stirling, 2003; Turnpenny e Ellard, 2007). A otimização da PCR engloba os seguintes aspetos:

- Concentração de enzimas: A concentração de Taq Polimerase recomendada é entre 1 a 2,5 unidades por 100 μ L de reação, isto, quando os outros parâmetros estão otimizados (Lawyer *et al.*, 1989). É importante referir que estes valores podem ser influenciados consoante a amostra, *primers* e até o próprio fornecedor da enzima. Devido a isto é recomendado o teste de concentrações entre 0,5 a 5 unidades/100 μ L. Concentrações elevadas de enzima levam a uma acumulação de produto inespecífico e concentrações baixas originam baixa quantidade de amplicões (Innis *et al.*, 1990)
- Concentração de Desoxinucleótidos tri-fosfato (DNTP's): A concentração dos diferentes DNTP's deve ser padronizada por métodos espectrofotométricos sendo desejável a concentração de 0,2 mM de cada um dos respetivos nucleótidos para evitar erros de incorporação e assim não afetar a fidelidade da reação (Boycott *et al.*, 2013; Mcpherson e Møller, 2006). A solução deve ainda estar neutralizada a pH 7,0 (Innis *et al.*, 1990). Concentrações baixas de DNTP's podem afetar a eficiência da PCR. Com a concentração de 200 μ M de cada nucleótido, é possível a formação de 10

µg de produto (Mcpherson e Møller, 2006). Deve-se por fim utilizar também a quantidade de nucleótidos mínima consoante o tamanho e a composição da sequência alvo, visto que tanto a especificidade, como a fidelidade da PCR aumentam com concentrações baixas de DNTP's (Innis *et al.*, 1990).

- **Concentração do Ião Magnésio:** A concentração do ião magnésio é dos fatores mais essenciais a ter em conta no protocolo de PCR. Este ião é responsável pela ligação dos *primers*, a dissociação das cadeias de DNA quer da amostra quer dos produtos, a especificidade dos produtos, a formação de *primer-dimer*, assim como a atividade da enzima Taq polimerase (Innis *et al.*, 1990). A concentração do ião magnésio livre é afetada pela concentração de DNTP's, existindo uma relação equimolar entre estes. A enzima Taq polimerase necessita de ião magnésio livre para exercer a sua atividade. A estratégia habitual para ajustar a concentração de magnésio provém em usar tampões que contenham $MgCl_2$ em diferentes concentrações entre 0,5 a 5 mM em passos de 0,5 ou 1 mM, sendo que uma concentração ótima resultará numa maior quantidade de produto obtido. A concentrações elevadas a fidelidade da Taq polimerase é reduzida resultando na amplificação de produtos inespecíficos. Concentrações muito baixas de magnésio resultam em pouco produto (Mcpherson e Møller, 2006).
- **Concentração de primer:** A concentração de primers é importante pois a concentrações elevadas pode levar a erros na ligação dos primers, isto pode levar à formação de *primer-dimers* ou produtos inespecíficos que são

também sujeitos à reação de PC. Isto resulta num rendimento reduzido por competição com a amostra na ligação dos diferentes compostos da reação. Concentrações de *primers* entre 0,1 e 0,5 μM são geralmente as melhores sendo sempre necessários dois *primers* diferentes, cada um específico para uma das duas cadeia de DNA (Innis *et al.*, 1990; Mcpherson e Møller, 2006). As características perfeitas de um *primer* são: o seu tamanho, que deve ser entre 16-30 nucleótidos, deve evitar espaços com três ou mais G's ou C's na cauda 3' pois isto leva a fraca ligação dos *primers* nas regiões ricas em GC. Por fim um *primer* ótimo não deve conseguir formar estruturas secundárias e não deve conter sequências nas suas caudas 3' que permitam a ligação a si próprio ou a outro *primer*, caso contrário, ocorre a formação de *primer-dimers* (Fig. 2) (Mcpherson e Møller, 2006).

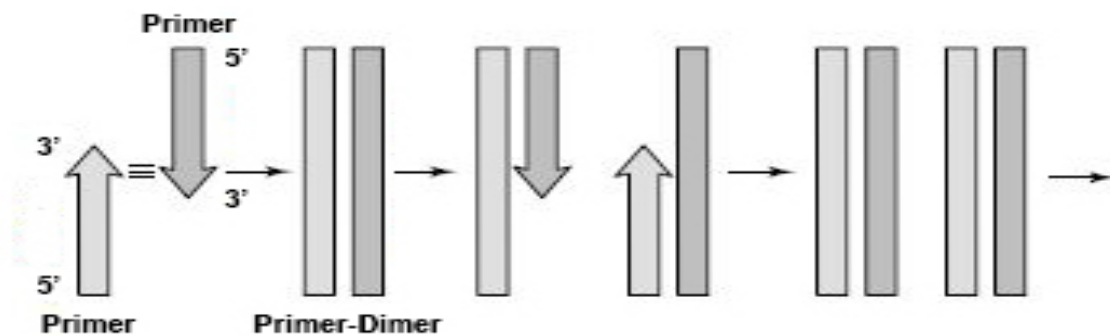


FIGURA 2 – Processo de formação de primer-dimers. Dois primers diferentes apresentam complementaridade pelo que hibridizam. Devido às cadeias 5' livres a DNA polimerase exerce a sua atividade, e com isso forma-se um primer-dímero. Esta estrutura é suscetível à amplificação por PCR, originando produto inespecífico à amostra, diminuindo a concentração de nucleótidos e primers disponíveis para a reação de PCR, imagem adaptada (Mcpherson e Møller, 2006).

- Outros componentes da reação: aqui são incluídos compostos como o Tris-HCL e o Cloreto de Potássio (KCL). O Tris-HCL é um tampão iónico dipolar (Mcpherson e Møller, 2006), sendo que a sua concentração recomendada é entre 10 a 50 mM (Innis *et al.*, 1990). O Tris-HCL é sensível

à temperatura reduzindo o pH em 0,1 unidades por cada aumento de 5°C de temperatura, devido a isto o pH antes do início da reação é ajustado até ao valor de 8,4 isto significa que aos 74 °C (a temperatura de extensão) o pH deve atingir valores de 7,4 que são valores desejáveis para as polimerases termo-resistentes (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). O KCL facilita a hibridização dos *primers* contudo em concentrações maiores ou iguais a 75 mM, este composto inibe significativamente a Taq polimerase. Em concentrações elevadas, o KCL pode levar à formação de produtos anómalos devido à estabilização de *primers* hibridizados incorretamente (Innis *et al.*, 1988; Mcpherson e Møller, 2006).

- Temperatura e tempo de desnaturação: A desnaturação é um passo essencial pois ao ser mal praticado leva a que a cadeia de DNA faça um efeito de “*snap back*”, o que significa que a DNA de cadeia dupla (dsDNA) não se torna em DNA de cadeia única (ssDNA), isto leva a que os *primers* não se possam ligar e a reação não ocorre. As temperaturas normais são de 95 °C por 30 segundos, ou 97 °C por 15 segundos (Innis *et al.*, 1990). Contudo cadeias com alto teor em GC e o uso de enzimas hot-start podem requerer valores de temperatura e tempos mais elevados. É recomendado o uso da menor temperatura e tempo possível visto que períodos de desnaturação com temperaturas e tempos elevados levam a perda desnecessária da atividade da enzima (Innis *et al.*, 1990; Mcpherson e Møller, 2006).
- Temperatura e tempo de hibridização: A temperatura necessária para a hibridização está dependente de fatores como a composição das bases, o tamanho e a concentração dos *primers*, sendo recomendado uma

temperatura de 5°C abaixo da T_m dos *primers* (Innis *et al.*, 1990). Contudo alguns investigadores recomendam o uso de uma temperatura inicial de 55°C sendo depois usados controlos para verificar se esta temperatura deve ser subida, mantida ou descida. De um modo geral temperaturas mais elevadas são melhores pois evitam o “*misspriming*”, ou seja, a ligação dos *primers* a outros locais sem ser a amostra. E outro fator importante é o tempo de hibridização que geralmente está entre os 30 e os 60 segundos, e que deve ser o mais curto possível, isto porque a Taq polimerase apresenta alguma atividade a esta temperatura o que pode potenciar a extensão de produtos inespecíficos (Mcpherson e Møller, 2006).

- Extensão dos *primers*: Este fator depende do tamanho e concentração da sequência alvo, assim como da temperatura que é, tradicionalmente, 72°C visto que a esta temperatura o ritmo de nucleótidos incorporados varia dos 35 aos 100 nucleótidos por segundo dependendo das condições da reação (Innis *et al.*, 1988). Tempos de extensão longos podem ajudar nos primeiros ciclos se a concentração de substrato é muito baixa e em ciclos tardios quando a concentração de produto excede a concentração de enzima, com isto em consideração é recomendado o tempo de 1 min a 72°C (Innis *et al.*, 1990).
- Número de Ciclos: Este valor é dependente da concentração do DNA alvo (Innis *et al.*, 1990). De um modo geral o número de ciclos deve ser o mínimo necessário para produzir produto suficiente para posteriores análises. Se uma reação de PCR não gerar produto suficiente deve-se em primeiro lugar aumentar a quantidade de amostra e depois aumentar o número de ciclos. É

também possível retirar alíquotas durante diferentes ciclos da reação de PCR e com o uso de electroforese em gel de agarose ver qual é o ciclo que gera maior quantidade de produto (Mcpherson e Møller, 2006). Um número elevado de ciclos pode levar ao aumento da quantidade e complexidade de produtos inespecíficos isto devido ao “*Plateau Effect*” que diz que em ciclos tardios há uma saturação das enzimas, logo produtos inespecíficos são preferidos para amplificação devido ao seu tamanho pequeno. Contrariamente um número baixo de ciclos leva a um rendimento baixo da reação (Innis *et al.*, 1990). Outro aspeto a analisar é o *ramping* da reação, ou seja, o tempo entre as alterações de temperatura que deve ser rápido para aumentar a especificidade (Mcpherson e Møller, 2006).

Um componente importante na reação de PCR é também a DNA polimerase usada. A primeira a ser usada foi a enzima DNA polimerase-I (também chamada de Fragmento de Klenow) obtida da *Escherichia coli*. Esta enzima é termossensível, isto significa que no final de cada ciclo era necessário adicionar nova enzima visto que a temperatura de desnaturação era suficiente para desnaturar a enzima. Isto tornava o processo de PCR muito trabalhoso e sujeito a contaminações. Devido a isto tudo, houve a necessidade de procurar uma nova polimerase sendo ela descoberta na bactéria *Thermophilus aquaticus*. A Taq polimerase é a enzima mais usada atualmente, e apresenta vantagens face ao Fragmento de Klenow visto que é termoestável, isto significa que à temperatura de 92,5 C° a semivida da enzima é de 130 minutos. Protocolos de PCR onde a temperatura não seja inferior a 70 C° são também tolerados, contudo uma subida de temperatura reduz rapidamente o tempo de semivida. Por exemplo, a temperaturas de 95 C° o tempo de semivida reduz-se para cerca de 40 minutos, isto significa que num protocolo de 50 ciclos

de PCR com esta temperatura e com um tempo de desnaturação de 20 segundos mais de 50% da enzima se encontrará desnaturada nos ciclos finais de PCR. A temperatura ótima de trabalho desta enzima é também vantajosa não só porque evita que qualquer estrutura secundária ou terciária presente na amostra interfira com a reação como evita o *misspriming* do par de *primers* usados a estruturas não-complementares ou parcialmente complementares. Outra vantagem da Taq DNA polimerase é não ser necessário adicionar enzima fresca durante o processo (coisa que era necessária em protocolos antigos visto que a enzima usada era termosensível e desnaturava-se ao final de cada ciclo de PCR). Uma outra característica interessante desta enzima é que possui maior processamento a temperaturas de incubação elevadas. O processamento descreve o número de nucleótidos que a enzima consegue ligar para formar um amplicão. Esse número é de 60 nucleótidos por segundo a 72°C, mas a 37°C esse número passa para 1,5 nucleótidos por segundo. É importante referir que o processamento é afetado pela presença de estruturas secundárias na amostra. Mas como foi dito anteriormente a temperatura ótima de trabalho desta enzima reduz a formação dessas mesmas estruturas secundárias, aumentando o processamento desta reação. Estas taxas de incorporação de nucleótidos da Taq polimerase acontecem porque a enzima não possui atividade exonucleolítica de proofreading (capacidade de detetar erros e os corrigir ao longo da sua ação), que atrasaria o processo de incorporação de nucleótidos na cadeia de DNA. A Taq polimerase tem também uma particularidade interessante, deixando um nucleótido suspenso, normalmente uma adenosina na região 3'-OH na cadeia de DNA dupla terminada. Esta propriedade da enzima tem sido usada para o desenvolvimento de estratégias rápidas e eficientes, de clonagem de PCR com o uso de vetores que contenham timina suspenso (conhecido como "TA-cloning"). Por fim esta enzima consegue produzir amplicões

maiores que o fragmento de Klenow, aguenta mais ampliações que este (o fragmento de Klenow consegue amplificar a mesma cadeia cerca de 200.000 vezes enquanto que a Taq atinge números de 2.000.000 de vezes), e consegue isto sem ser inibida por contaminantes químicos que possam estar presentes após a extração do DNA (ex. Clorofórmio ou citratos).

Apesar destas vantagens todas, a Taq Polimerase apresenta as suas desvantagens como por exemplo a sua suscetibilidade à proteólise. Por isso é recomendável a adição desta enzima após a fase de desnaturação inicial (altura em que as enzimas proteolíticas se desnaturaram). Contudo na prática o uso dos kits de extração de DNA reduz este risco. Além disto, outra desvantagem da enzima Taq é que é inibida por compostos usados em reações bioquímicas e de biologia molecular como por exemplo dimetilsulfóxido, ácido etilenodiamino tetra-acético e Agar. Novas enzimas têm sido então procuradas com melhores características de termosensibilidade (permitindo um maior número de ciclos, desnaturação a maiores temperaturas e períodos de desnaturação mais longos) e com a capacidade de proofreading 3'-5' (como por exemplo a Vent ou DeepVent), que é desejado quando se realiza deteções de mutações onde é necessário que a incorporação de nucleótidos errados na cadeia de DNA seja a menor possível. É também importante referir que as condições do trabalho laboratorial, como a concentração de magnésio, o pH por exemplo pode alterar os valores ótimos da enzima.

Em adição a estas novas enzimas, as enzimas atualmente existentes foram melhoradas, quer seja no método de purificação (retirando DNA do microrganismo de origem) quer seja a criação de enzimas que se ativam pelo calor. Estas enzimas precisam de um período de tempo à temperatura de desnaturação para ganhar atividade um processo denominado de “*hot-start*”. Este processo ajuda a evitar a amplificação de produto

inespecífico durante o período de aquecimento (tempo necessário para a mistura de PCR alcançar a temperatura de 95°C). Para obter estas enzimas existem diversos processos, como por exemplo a alteração da molécula para uma forma inativa, mas que após alcançar a temperatura de desnaturação retorna à sua forma ativa. Outra tática usada é a ligação de compostos ou anticorpos monoclonais ao centro ativo da enzima que ao atingir temperaturas mais elevadas se desassociam da enzima deixando-a livre para atuar (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

Uma desvantagem da PCR é a necessidade de aplicar uma técnica secundária, que tem como função a análise do produto obtido pela PCR, sendo a mais usada a eletroforese em gel de agarose, onde basicamente é colocada uma alíquota do produto obtido por PCR, em gel de agarose com uma pequena quantidade de Sybr Green ou de brometo de etídio (Bartlett e Stirling, 2003; Mcpherson e Møller, 2006). O gel sofre então uma corrente elétrica e o DNA sendo uma molécula de carga negativa migra para o polo positivo, e quanto menor o seu tamanho molecular, maior a facilidade da migração no gel. É também usado um controlo positivo, controlo negativo e um marcador de pesos moleculares para respetivamente avaliar a qualidade da mistura de reação, a eventual presença de contaminações na PCR, e medir o peso molecular do(s) produto(s) obtido(s), sabendo assim se o produto amplificado é o desejado.

O gel depois é colocado sobre uma luz UV que torna as diferentes bandas bem visíveis podendo os resultados ser fotografados com uma câmara. Outras técnicas podem também ser usadas para a análise dos produtos obtidos por PCR como por exemplo a sequenciação direta que tem como vantagem a identificação de erros que possam acontecer aleatoriamente durante o processo de PCR daí ser conveniente fazer a sequenciação de grande parte do produto de PCR. É importante referir por último, o

método de *Nested PCR* que tem como objetivo o aumento da sensibilidade da reação de PCR reduzindo em simultâneo os produtos inespecíficos formados. O princípio baseia-se no uso de *primers* internos que se associam ao produto da PCR no segundo ciclo de amplificação, que são específicas desse DNA obtido. Isto leva a que produtos inespecíficos, visto que não têm afinidade para os novos *primers* internos, não sejam amplificados, aumentando-se assim a sensibilidade e a especificidade da reação (Mcpherson e Møller, 2006).

2.1.2. PCR Multiplex

Os Protocolos de PCR Multiplex, utilizam múltiplos *primers* diferentes, todos colocados na mesma mistura de PCR, com o objetivo de amplificar diferentes regiões alvo ao mesmo tempo. Desta forma este tipo de PCR facilita a deteção de diferentes alvos, num PCR, o que leva à deteção de génotipos de doenças complexas, sendo por isso utilizado em genética clínica. O número de *primers* máximo a ser adicionado vai depender das características da reação de PCR (ex. Temperatura de *annealing*, concentração do ião Magnésio, concentração de DNTP's, entre outros referidos no capítulo 2.1). Esses *primers*, são mais longos (23-28 nucleótidos) do que aqueles usados na PCR convencional e são escolhidos, consoante as suas T_m 's e razão de guanina/citosina, que devem ser similares (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). A concentração dos diferentes *primers* não tem de ser equimolar para uma boa otimização da reação (Berg *et al.*, 2000). Em casos mais complexos, é recomendado a adição de aditivos como por exemplo o glicerol ou a formamida, compostos que interferem com a estrutura secundária do DNA influenciando a acessibilidade dos *primers* e a eficiência da hibridização destes com o alvo (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Estes Protocolos de Multiplex PCR são vantajosos devido

ao facto de múltiplas análises científicas e de diagnóstico não poderem ser realizadas devido à quantidade de DNA disponível não ser suficiente para todos os ensaios de PCR necessários (Kebelmann-Betzing *et al.*, 1998). Esta técnica foi usada por exemplo para a análise da deficiência em Acil-coenzima A desidrogenase de cadeia média, doença que causa hipoglicemia hipocetónica, vômitos, letargia, ataques hepatomegalia e pode levar a coma e morte (Matern e Rinaldo, 1993).

2.1.3. ARMS-PCR

O Sistema de Amplificação Refratário a Mutações (ARMS) consiste no uso de dois *primers*, um específico para um alelo normal e outro para um alelo mutado, o Primer mutado difere nos nucleótidos 3' sendo por isso específicos para mutações. Devido a isso é importante referir que a polimerase utilizada nesta reação de ARMS PCR, não deve ter a capacidade de corrigir erros durante o processo (*proofreading*) (Mcpherson e Møller, 2006). A razão pela qual esta técnica funciona provém do facto que a polimerase apenas estende o DNA se os respetivos *primers* tiverem complementaridade com uma grande parte da sequência, na zona 3' sendo assim possível a deteção de pequenas mutações (Fig. 3), o que torna esta técnica bastante sensível (Newton *et al.*, 1989).

É importante referir que esta técnica teve alterações com diferentes objetivos. Como exemplos dessas alterações temos: “*Double ARMS*”, “*ARMS fluorescente*” e “*Multiplex ARMS*”. O primeiro tem como vantagem conhecer o haplótipo de um indivíduo quando o DNA dos parentes não está disponível e se o indivíduo for heterozigótico a dois lugares polimórficos, para isso são usados dois *primers* específicos ao alelo e a amplificação apenas ocorre quando estes dois *primers* de ARMS se ligam aos alelos específicos num mesmo cromossoma (Kumar e Garg, 2005).

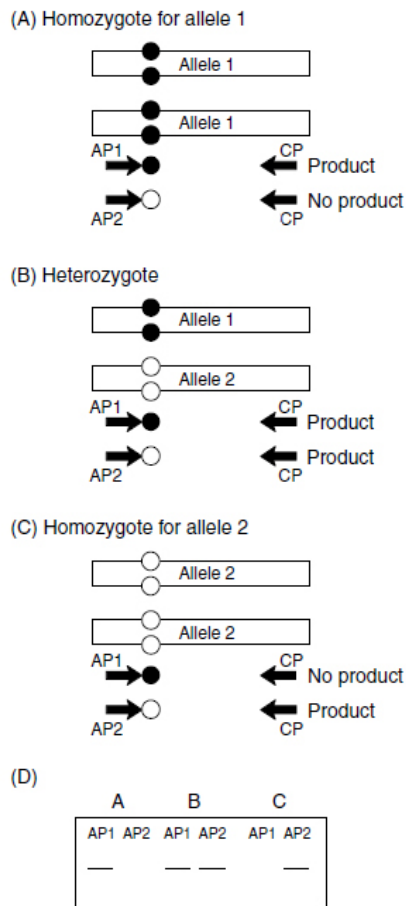


FIGURA 3 – Demonstração esquemática do ARMS PCR, onde é possível observar 3 tipos de alelos. Um heterozigótico (B), e outros dois homozigóticos para um alelo 1 e 2 (A e C respetivamente). Usando primers específicos para esses alelos pode ser descoberto, após análise do produto obtido, o alelo que o indivíduo possui. Sendo possível saber se o indivíduo possui ou não uma mutação (Mcpherson e Møller, 2006).

diferentes, ou até ambos (Coleman e Tsongalis, 2006).

Como foi acima escrito o ARMS PCR é uma técnica eficiente na pesquisa de mutações, é também um processo rápido, economicamente apelativo e de grande facilidade de planear e trabalhar visto que não requer nenhum material a mais para além do necessário para um simples PCR, e é mais facilmente multiplexado (Cheadle *et al.*,

É também importante referir que este teste é útil para a haplotipagem de indivíduos duplamente heterozigóticos, distinguindo se duas mutações estão em cis/trans, e pode também ser usado para distinguir um portador de uma desordem (Coleman e Tsongalis, 2006). O segundo tipo de ARMS PCR é o uso de *primer* de ARMS e um *primer* selvagem associados a fluorocromos que são incorporados na reação de PCR. Devido a isto, este é o teste mais complexo e com maior especificidade (Kumar e Garg, 2005). O terceiro, o multiplex ARMS PCR funciona usando diferentes *primers* que irão procurar por diferentes mutações, sendo por isto mais vantajoso (Chang *et al.*, 1997). O processo de criação de *primers* que não interfiram uns com os outros pode ser complicado sendo eles distinguíveis por tamanhos ou marcadores

1992). Esta técnica foi, por exemplo, utilizada para o estudo da homocisteinúria devido à deficiência de cistationina beta-sintetase (Sokolova *et al.*, 2001) doença que causa vários sintomas a nível ocular, neurológico, esquelético e vascular (Saudubray *et al.*, 2016).

2.1.4. RT-PCR

A Reação das Polimerases em Cadeia de Transcriptase Reversa (RT-PCR) permite a análise de RNA, o que é importante para a avaliação da transcrição de genes (Bustin, 2000). O passo inicial para a RT-PCR consiste na conversão de

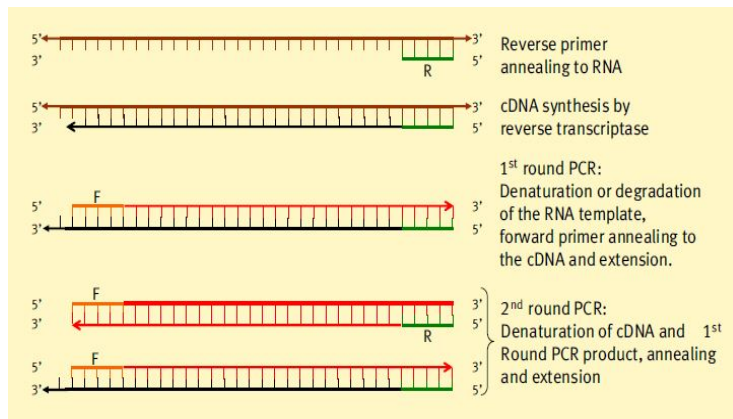


FIGURA 4 – Reação de RT-PCR num geral. Numa fase inicial liga-se à extremidade 3' do RNA um primer reverso (**R**). Depois a Transcriptase Reversa atua e origina o cDNA, que é desnaturado hibridizado com um primer (**F**) e realiza-se a reação de PCR (Evans, 2009).

RNA em DNA complementar (cDNA), visto que a DNA polimerase apenas funciona na presença de DNA. Para essa conversão as duas enzimas mais utilizadas são a *Avian myeloblastoma virus (AMV) reverse transcriptase* e a *Moloney murine leukaemia vírus (M-MuLV) reverse transcriptase* e existem três estratégias diferentes para isso (Evans, 2009): um primer oligo-dT que se liga à cadeia poly-A do RNA; o uso de nucleótidos *hexamer* ou *nonamer*; ou um primer específico para o gene de interesse. O cDNA já pode ser usado como substrato das DNA polimerases termoestáveis e com isto é possível então realizar a PCR como normal (Fig. 4) (Mcpherson e Møller, 2006). Na investigação dos erros hereditários do metabolismo, o RT-PCR serve como suplemento à sequenciação de exões e zonas de corte para identificar variantes de corte inesperados e deleção de exões

(Strachan e Read, 2011), tendo já sido usado para a investigação da deficiência em arginina:glicina amidinotransferase que é a enzima que catalisa o primeiro passo da criação da creatina (Item *et al.*, 2001). Pacientes com esta doença sofrem de atraso mental, epilepsia, sintomas extrapiramidais (Stockler *et al.*, 1996), atrasos na fala assim como sinais eletrofisiológicos e histopatológicos de miopatia (Saudubray *et al.*, 2016).

2.1.5. PCR em Tempo Real (qPCR)

Um dos graves problemas com as técnicas descritas até agora, é a necessidade da análise do produto obtido, normalmente por electroforese em gel de agarose. A PCR em Tempo Real (qPCR) vem resolver este problema, tornando-se numa técnica de primeira linha na análise de rearranjos genéticos, expressões de genes, amplificações e mutações. Esta técnica consiste na análise do produto obtido da PCR a cada ciclo deste, isto é conseguido usando fluorescência, que pode ser usada de forma direta (quantificação de um produto específico a uma determinada sequência de interesse) ou de forma indireta (quantificação de produtos de PCR sem ser de maneira específica), ambos estes métodos são rápidos e sensíveis, contudo, a otimização e o princípio de deteção é diferente (Dorak, 2006). A vantagem de métodos indiretos ou inespecíficos, é que o custo destes é bastante reduzido, e o protocolo é pouco elaborado, o que os torna atrativos para a análise de polimorfismos de um nucleótido. O composto mais usado para esta análise é o SYBR green I que funciona ligando-se a qualquer estrutura de dsDNA (independentemente da sequência) e ao estabelecer esta ligação ele passa a emitir fluorescência, logo a quantidade de fluorescência é proporcional à quantidade de produto obtido (Fig. 5) (Fuchs *et al.*, 2005). Apesar das vantagens deste composto, como o seu custo, ele é inespecífico logo a

presença de produto inespecífico de PCR pode também contribuir para o aumento da fluorescência.

Este tipo de compostos também não funciona para multiplexação devido ao facto de ser impossível distinguir a fluorescência de diferentes amplicões. Devido a

isto surgiu a necessidade da criação de novos sistemas químicos de fluorescência tendo

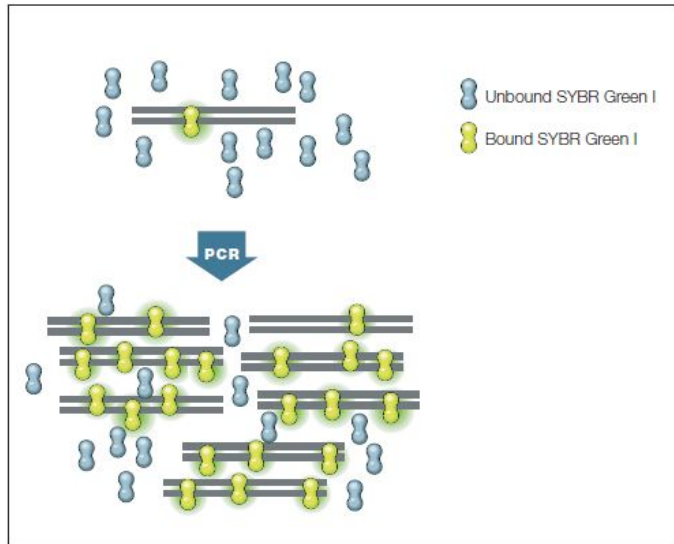


Figura 5 – Representação gráfica do funcionamento do SYBR green I. Este composto apenas apresenta fluorescência quando ligado a dsDNA (cor verde). A fluorescência aumento com o aumento da quantidade de produto de PCR (Biorad Inc., 2006).

então surgido as tecnologias de *primer* fluorescente e sondas. Ambas funcionam no mesmo princípio, na transferência ressonante de energia fluorescente de forma a que apenas ocorre fluorescência na presença de um alvo, ou seja, na mistura de PCR é adicionada um fluorocromo chamado de “*reporter*” que se encontra fisicamente perto de uma outra molécula responsável por “extinguir” a sua fluorescência, a esta molécula damos o nome de “*quencher*”. Ao ligar-se a uma sequência alvo específica, o *quencher* e o *reporter* separam-se obtendo-se assim fluorescência (Biorad Inc., 2006).

Independentemente do método utilizado, o procedimento funciona da mesma forma. São utilizados padrões de DNA diluído. Para análise mede-se a fluorescência a cada ciclo de PCR a esse gráfico de fluorescência em relação ao ciclo e é obtido o valor limiar de fluorescência (Ct) (Fig. 6). Além de analisar a quantidade de produto originado a cada ciclo, é também possível realizar a análise da temperatura de fusão. Isto faz-se analisando a fluorescência com o aumento da temperatura entre os 50°C e os 95°C. Primer-dimers,

produto inespecífico ou sequências com erros de ligações têm geralmente um ponto de fusão menor, daí ser possível distingui-los do produto da PCR desejado (Fig. 7) (Keer e Birch, 2008). Existem diversas tecnologias de detecção direta de produto de PCR as quais são: ensaio Taqman, sinalizadores moleculares, sondas de hibridização, sondas eclipse, primer ampifluor, primer scorpion, primer LUX e finalmente o primer BD QZyme (Fig. 8) (Biorad Inc., 2006). Finalmente este tipo de PCR é passível de ser usado em conjunto com outras tecnologias descritas como a multiplexação, sendo possível procurar por várias sequências alvo, nomeadamente, até cinco sequências. Um dos graves problemas é a quantificação de genes em baixa concentração, algo que ocorre por exemplo em estudos de expressão genética, em que um gene de interesse é comparado com outros genes de referência que se estiverem numa concentração mais elevada pode comprometer a amplificação do gene de interesse. Para contornar este problema é necessária uma boa otimização da reação assim como uma boa escolha de *primer's* e método de fluorescência. Por fim deve-se sempre validar os ensaios de multiplex qPCR usando singleplex qPCR e comparar os valores de Ct, que devem ser idênticos (Biorad Inc., 2006). Um exemplo de doença estudada por esta técnica é deficiência em dihidrofolato redutase uma doença que causa anemia megaloblástica, convulsões e em casos severos atrofia cerebral atrasos no desenvolvimento e pancitopenia (Banka *et al.*, 2011; Saudubray *et al.*, 2016).

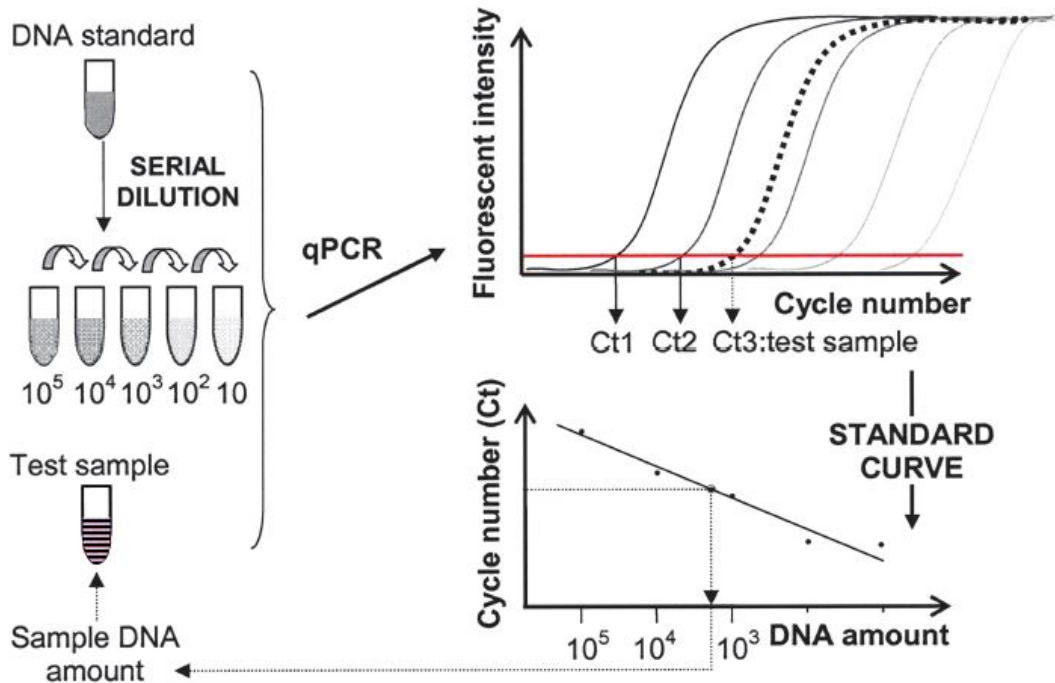


Figura 6 – Demonstração do processo de qPCR. Usando um padrão de DNA, é realizado um conjunto de diluições. Depois é medida a fluorescência dessas soluções e da amostra, ao longo dos ciclos. Após isso, estabelece-se o Ct de cada padrão e amostra (o limiar mínimo de fluorescência – a linha vermelha), e com estes valores é estabelecida uma curva de calibração onde é possível dosear a quantidade de DNA na amostra (Keer e Birch, 2008).

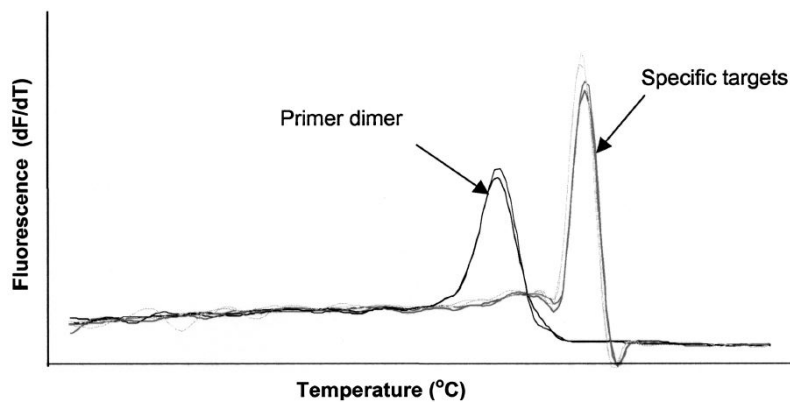


Figura 7 – Exemplo da análise da temperatura de fusão do produto de PCR onde é possível observar dois picos, o mais alto corresponde ao produto obtido da PCR, e o mais pequeno corresponde a produto inespecífico (Keer e Birch, 2008).

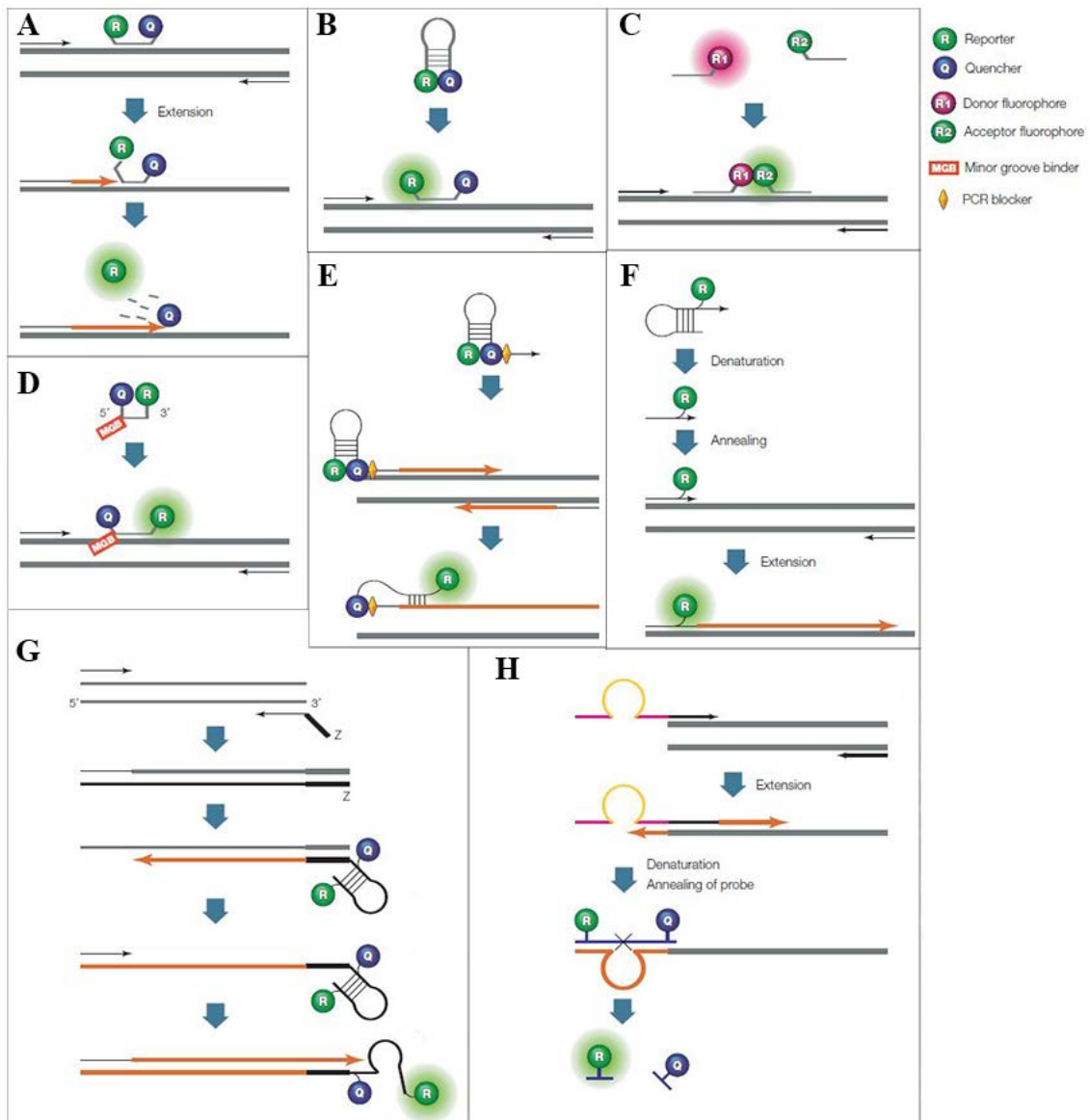


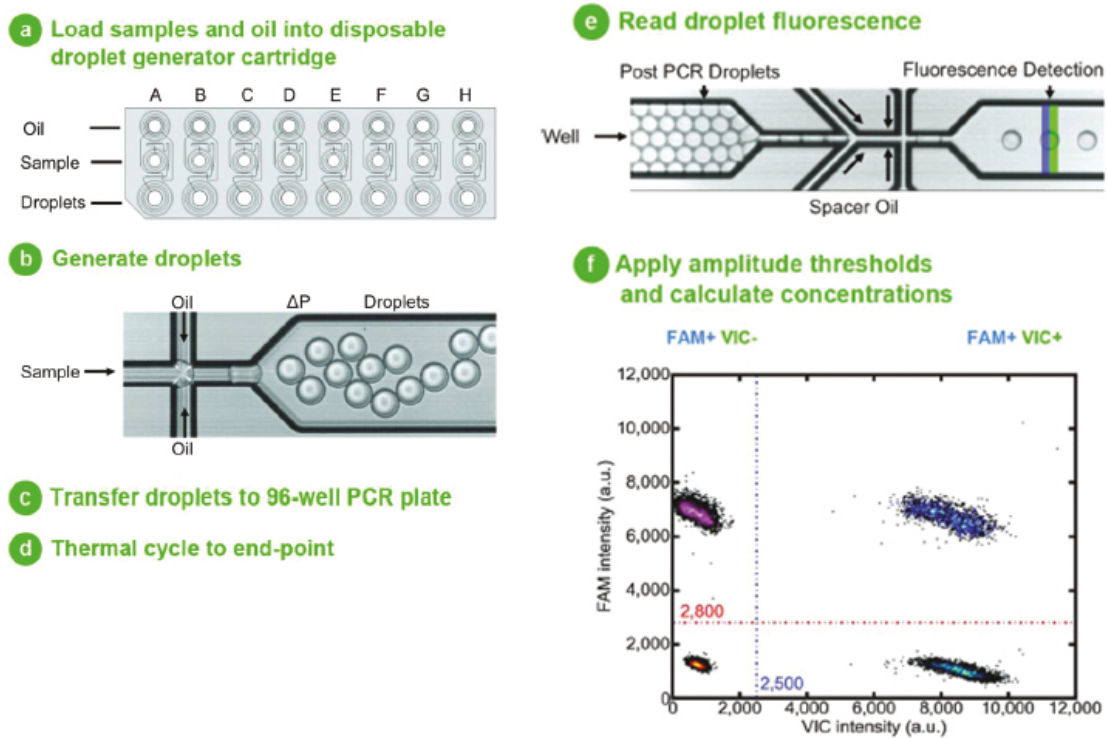
FIGURA 8 - Tipos de métodos para a deteção direta de produto em PCR. **A** – Ensaio Taqman, usando uma sonda Taqman, esta hibridiza com uma sequência DNA alvo, e devido à atividade da Taq polimerase o quencher (**Q**) é clivado e o reporter (**R**) passa a emitir fluorescência; **B** – sinalizadores moleculares são estruturas específicas a uma sequência alvo de DNA, que formam uma estrutura em “ganchos de cabelo”, nas pontas desta estrutura estão o Q e R muito próximos daí não há sinal detetável, durante a PCR esta estrutura desnatura e hibridiza com o DNA que separa o Q e o R permitindo que este último emita sinal; **C** – sondas de hibridização, nesta tecnologia são usados dois primers, um com fluorocromo na extremidade 3’ (**ador** – **R1**) e outro na extremidade 5’ (**aceitador** – **R2**) durante a reação de PCR estes dois primers hibridizam com a sequência alvo e aproximam-se, R1 excita a R2 fazendo com que este apresente luminosidade, que é possível detetar no comprimento de onda de R2; **D** – Sonda Eclipse o seu funcionamento é parecido com **B** apresenta apenas um composto **MGB** (Minor Groove Binder) que é responsável pela ligação da sonda à amostra; **E**- Sonda Scorpion, estas sondas ligam-se ao DNA e possuem a capacidade de bloquear a reação da PCR, num segundo ciclo a sonda desnatura-se e liga-se ao produto da reação anterior, e assim o R pode emitir sinal; **F** – Primer LUX, este primer não possui Q, isto devido ao facto que a própria estrutura da sonda omite a luminosidade do R, contudo ao hibridizar com DNA a estrutura altera-se podendo o sinal destes primers ser detetado; **G** – Primer Amplifluor neste caso há um **primer Z** que é ligado a uma amostra e é amplificado, após isso o Uniprimer (que possui o Q e o R) liga-se à sequência do primer Z, este ao ser usado como amostra para um novo ciclo altera a estrutura, separando o Q e o R e este último emite fluorescência; **H** – Primer BD QZyme neste caso um primer Zymogene é responsável por formar uma porção de DNA catalítico após isso um segundo primer com o Q e o R é ligado a essa porção de DNA catalítico e durante o processo de PCR este primer é clivado, separando o Q do R emitindo esta luminosidade, imagem adaptada (Biorad Inc., 2006).

2.1.6. PCR Digital

A PCR digital (dPCR) permite a quantificação precisa e sensível de ácidos nucleicos. dPCR implica repartir uma reação de PCR em centenas ou milhares de sub reações, sob condições em que algumas amplificam (indicando a presença do DNA alvo), e outras não (indicando a sua ausência). Estas sub reações são analisadas separadamente e a razão entre reações positivas e negativas é precisamente indicativa da quantidade de moléculas alvo presentes na amostra inicial. dPCR consegue então quantificar ácidos nucleicos de uma forma precisa e direta, independentemente da eficiência da amplificação da PCR e sem a necessidade do uso de curvas de calibração (necessárias para o qPCR) (Biaassoni *et al.*, 2014). Como já foi suprarreferido a técnica do dPCR baseia-se na capacidade de uma reação de PCR detetar uma única molécula de um locus alvo. Para isso, a amostra é diluída em diferentes partições onde se verifica a presença, ou ausência de reação. Sabendo isto, é possível obter uma quantificação absoluta da quantidade de sequência a amplificar, isto porque a divisão da reação em alíquotas permite que cada poço contenha apenas uma molécula de DNA. Isto seria o pretendido embora nem sempre a amostra é diluída até esse ponto, resultando em que maior parte das alíquotas apresentem um resultado positivo, embora tenham presente mais que uma molécula de DNA alvo. Isto leva a problemas de quantificação absoluta, contudo com a equação de *Poisson* ($\lambda = -\ln(1-p)$) onde λ representa o número médio de moléculas por alíquota e o p a proporção de poços com resultado positivo, é possível corrigir este erro, permitindo assim a quantificação absoluta de uma determinada sequência (Day *et al.*, 2013). Para que ocorra a divisão das moléculas da amostra, existem dois métodos, os quais são (Butchbach, 2016): as câmaras nano fluídicas ou a emulsificação da amostra de DNA e da mistura de

PCR em gotas de tamanhos nanométricos. O primeiro consiste em colocar a amostra num chip com 12 painéis, cada um com ou 765 ou 1104 poços de volumes nanométricos, a amostra não é diluída, mas sim repartida por esses poços onde a reação de PCR ocorre individualmente, em junção com sondas que detetam a presença de uma sequência alvo. Esse chip onde a amostra é colocada, é então submetido aos ciclos de temperatura da PCR, sendo posteriormente analisado em sistemas específicos, como o sistema Biomark® da Fluidigm que não só faz a ciclização da temperatura, como também analisa a presença de fluorescência, contando o número de poços que a possuem (Dube *et al.*, 2008).

Outra grande abordagem para a separação da amostra consiste na formação de pequenas gotículas onde estão presentes a amostra e onde é realizado a PCR. Este sistema é uma variante da PCR digital e é denominado por PCR digital em gotículas (ddPCR) e funciona colocando em placas próprias a mistura de PCR em conjunto com a amostra. Muito próximo desse poço é colocado um óleo no qual estão misturados surfactantes estabilizantes. Estes dois poços estão bastante próximos e ligados por tubos muito finos. Após estar tudo inserido na placa é aplicado neste vácuo, que permite a circulação e a junção do conteúdo dos dois poços. Devido à ação dos surfactantes são formadas pequenas gotículas estáveis (cerca de 1000 por segundo) onde a amostra e a mistura de PCR se encontram. Estas gotas fluem para um terceiro poço onde são coletadas e devido a diferenças de densidade, formam uma camada por cima do óleo em excesso. Essas gotas são então transferidas por pipetagem para placas PCR de 96 poços. Essas placas são posteriormente submetidas a ciclos de temperatura. Depois disto a placa é levada a um leitor de gotículas que suga as gotículas presentes em cada um dos poços e analisa a presença da sequência alvo em cada uma delas (Fig. 9) (Hindson *et al.*, 2011).



É também importante referir que a ddPCR pode também ser usado para procurar múltiplas sequências alvo, a multiplexação é mais simples em dPCR do que em qPCR, isto devido à separação da reação por poços e ao efeito do enriquecimento (Enrichment effect). Na multiplexação de qPCR a identificação de algumas sequências alvo pode ser mais difícil devido às diferentes concentrações a que estão presentes. Contudo com dPCR existe o efeito do enriquecimento, que simplesmente diz que, ao dividir a reação há uma diminuição da concentração da sequência alvo de maior concentração o que torna as

sequências em menor concentração mais fáceis de detetar (Biassoni *et al.*, 2014). Para a Multiplexação de ddPCR é necessário previamente produzir gotículas que contenham apenas sondas, consoante o número de sequências alvo, formando um conjunto de gotículas que é depois injetado durante a formação das gotículas para ddPCR. As gotículas com sondas são mais pequenas que as gotículas de ddPCR e juntam-se a estas com facilidade. No final do processo de ddPCR é analisado quais as sequências presentes, sendo realizado a análise estatística dos resultados, onde é relacionado o sinal obtido das gotículas com o tamanho destas. Analisando o tempo que estas demoram a passar o feixe de luz em milissegundos, isto separa quaisquer gotículas que contenham sonda que não se conseguiram fundir com a amostra de DNA, sendo após isso analisado por *scatter* para doseamento das sequências alvo. Este multiplexing foi usado para procurar pelas 6 mutações mais comuns no codão 12 do oncogene KRAS responsável por vários tipos de cancro (Pekin *et al.*, 2011). Outro método de multiplexação, também utilizado para ddPCR é o uso de sondas capazes de se ligarem a cadeias duplas de DNA como por exemplo a sonda EvaGreen que pode ser usada em maior quantidade que outras sondas de dsDNA (ex. SYBR Green) e tem mais afinidade para dsDNA do que ssDNA. É também espectralmente próxima da sonda de Amidita de Fluoresceína (Mao *et al.*, 2007). O uso do ddPCR ainda se encontra em desenvolvimento, contudo está a ser usado como método de diagnóstico pré-natal de uma forma menos invasiva (Camunas-Soler *et al.*, 2017).

2.2. Diagnóstico com Sequenciação

Com a evolução das tecnologias, surgiram novas técnicas de sequenciação de alto rendimento, eficiência e economicamente acessíveis, aumentando a prevalência da sequenciação do genoma no ramo clínico e da investigação (Solomon *et al.*, 2013). A evolução das técnicas de sequenciação permite o desenvolvimento da comparação da genómica que demonstra os programas moleculares de diferentes organismos. Permite detetar alterações genómicas ou epigenómicas, assim como mutações num único nucleótido, eliminações ou inserções no genoma, rearranjos do cromossoma, variações de números cópia e metilação de DNA, que são responsáveis pela elevada suscetibilidade dos indivíduos a diferentes doenças. Finalmente a evolução da sequenciação, nomeadamente com a elaboração de projetos pessoais de sequenciação, permite um diagnóstico, prognóstico e guia terapêutico mais correto para o doente (Dong e Wang, 2012). A sequenciação começou em primeiro lugar com a sequenciação de Sanger que ainda é utilizada e consiste em realizar uma reação de polimerização de DNA na qual estão inseridos nucleótidos alterados, os ddNTP's, com fluorocromos diferentes adicionados em muito baixa concentração (ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP respetivamente), estes nucleótidos têm a capacidade de terminar a reação de amplificação dado que não conseguem estabelecer ligações fosfodiéster com outros nucleótidos. Devido a isto ao realizar a reação de polimerização originam-se produtos de diferentes tamanhos, que são posteriormente separados em eletroforese capilar com deteção da fluorescência associada ao ddNTP, permitindo saber então a sequência de uma amostra (Shendure e Ji, 2008). Novas tecnologias de sequenciação (NGS ou Sequenciação de Próxima geração) foram surgindo que aumentaram a quantidade de bases sequenciáveis

por reação e reduziram o tempo necessário para a análise. Atualmente estas tecnologias são ainda usadas e são compostas por (Mardis, 2008): a tecnologia Roche com Pirosequenciação, a tecnologia Illumina que se baseia na técnica de sequenciação por síntese, a sequenciação SOLiD e a tecnologia Ion Proton. Estas técnicas apesar de possuírem princípios diferentes, uma coisa comum entre elas é a necessidade de uma reação de PCR. Contudo, também o PCR foi eliminado com as técnicas que até à data representam a vanguarda da sequenciação: as técnicas de 3º e 4º geração. Exemplos das técnicas de 3º geração são: a Helicos Heliscope, e a tecnologia da Bioscience (Munroe e Harris, 2010). Das técnicas de 4º geração apenas o Oxford nanopores, é já comercializado (Niedringhaus *et al.*, 2011).

O Helicos Heliscope foi uma das primeiras técnicas a surgir com a capacidade de sequenciar uma única molécula de DNA e consiste em cortar uma molécula de DNA e a tornar em vários fragmentos de ssDNA, a estes fragmentos é adicionada uma cadeia poli-A pela poliadenosina polimerase. Esta cadeia é então fixada numa placa onde se procede a sequenciação por síntese. São adicionados nucleótidos marcados com fluocromos. Quando ocorre a ligação, os restantes fluocromos são lavados, é sequenciado o nucleótido que se ligou, excitando o fluocromo, que é depois clivado e volta-se a repetir o ciclo até se obter a sequência completa. A principal desvantagens deste método é o sinal fraco, devido a não se usar uma reação de PCR, além disso como as moléculas da amostra se encontram ligadas por hibridização, é possível que alguma da amostra seja lavada, e outra desvantagem é a possibilidade que o processo de sequenciação seja terminado por incorporação de nucleótidos incorretamente sintetizados (Kircher e Kelso, 2010).

A tecnologia Bioscience, também chamada de Sequenciação de molécula única de DNA em tempo real (sequenciação SMRT) consiste numa placa de vidro que contém

milhares de poços de tamanhos nanométricos (cerca de 10 nm de largura e 100 nm de profundidade) no qual no fundo está fixado uma polimerase. Após tratamento da amostra liga-se um ssDNA a esta polimerase sendo posteriormente inserido no poço nucleótidos ligados a fluorocromos, sendo que quando um determinado nucleótido é incorporado, é libertada iluminação específica consoante o nucleótido. Um dos grandes problemas no uso de fluorocromos na sequenciação é a quantidade de ruído de fundo que em leituras longas torna o processo de sequenciação pouco exato. A sequenciação SMRT apresenta então duas soluções para este problema. Em primeiro lugar o volume de deteção da SMRT foi reduzido para 20 zeptolitros ($2,0 \times 10^{-20}$ l). Este volume reduzido diminui a quantidade de ruído formado. Em segundo lugar, ao contrário de outros sistemas de sequenciação em que o fluorocromo se encontra ligado diretamente ao nucleótido, na sequenciação SMRT o fluorocromo encontra-se ligado a cinco grupos fosfato (penta-fosfato). Esta cadeia, que está ligada ao nucleótido, é quebrada na incorporação dos nucleótidos, e ajuda na eliminação destes do poço (Eid *et al.*, 2009).

Os Oxford nanopores têm como princípio de ação a análise de ácidos nucleicos, à medida que estes atravessam um poro que se encontra suspenso numa membrana. Ao passar por esse poro há uma interrupção do fluxo de iões específica a cada nucleótido (Fig. 10) (Ansorge *et al.*, 2017). Vantagens notáveis neste método são os custos, visto que não são necessários nucleótidos marcados nem sistemas de deteção ótica. Esta técnica apresenta também elevada versatilidade pois oferece a possibilidade de analisar moléculas de RNA (Munroe e Harris, 2010) assim como detetar metilações dos nucleótidos (Clarke *et al.*, 2009), o que é importante para o estudo da expressão genética dos diferentes genes, sendo este método mais vantajoso que outros que consistiam em

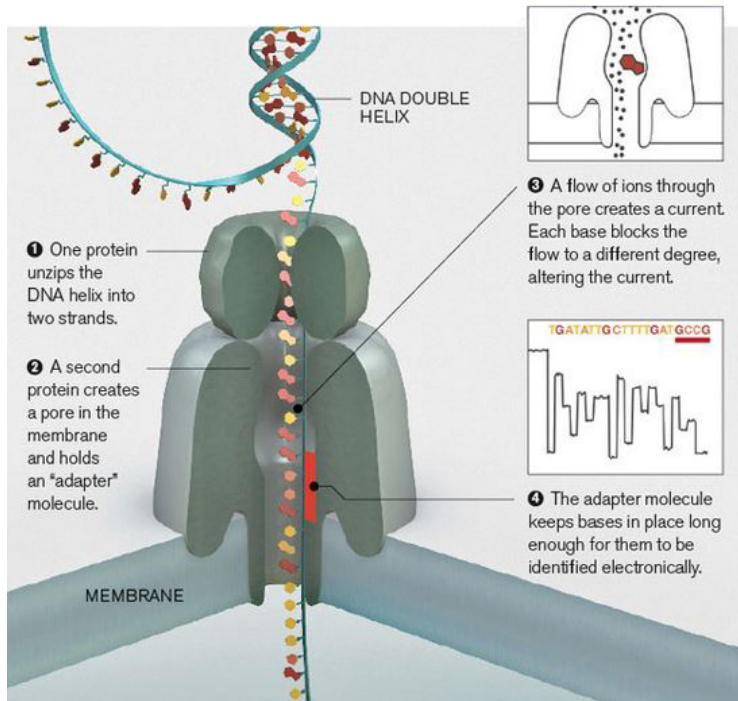


FIGURA 10 – Demonstração da sequenciação por nanoporos, onde é possível observar uma proteína que é capaz de tornar dsDNA em ssDNA (1). O ssDNA passa por uma outra proteína inserida numa membrana e que cria um poro através do qual passa. Na membrana é aplicada uma corrente, que cria um fluxo de íons que atravessa o poro. A passagem do ssDNA pelo poro irá obstruí-lo parcialmente, interferindo com a passagem de íons, a interferência nesta corrente é específica de cada nucleótido e, é o que permite a sequenciação (2 e 3). Por último um adaptador é necessário para manter as bases no lugar correto o tempo suficiente para serem lidas (4). Imagem adaptada (Schaffer, 2012).

converter bases C em U sem interagir com o C metilado seguido de sequenciação (Hayatsu, 2008).

Possíveis desenvolvimentos desta técnica é o uso do poro em plataformas sólidas em vez de poros orgânicos com proteínas. Isto reduzirá os custos e ajudará na produção em massa dos chips, aumentando também a reprodutibilidade. Os desafios são: a espessura da membrana que atualmente se encontra entre os 10 e os 20

nm o que não permite a leitura de uma única base e a rapidez pelo qual o DNA passa pelo poro, que não é suficientemente lenta para permitir a leitura. Para eliminar isto foi sugerido o uso de uma polimerase associada ao poro (Cherf *et al.*, 2012).

Utilizando as técnicas acima descritas, e com a evolução no campo da sequenciação, é possível realizar dois tipos de sequenciação maior, a sequenciação do genoma completo (WGS) e a sequenciação do exoma completo (WES). A sequenciação do exoma, parte dos genes que engloba todos os exões, as partes do genoma que codificam as proteínas, que corresponde a aproximadamente 1-2% dos 6 mil milhões de bases do genoma

diploide (Solomon *et al.*, 2013). Os exões são essenciais para compreender a relação entre a variação dos alelos e fenótipo porque inclui a região codificadora dos genes, o que permite conhecer a alteração responsável pelas doenças Mendelianas, visto que a maior parte destas tem origem no exoma (Biesecker *et al.*, 2011). A WES é atualmente a preferida dentro destes dois tipos de sequenciação, embora ambas sejam ferramentas poderosas para a identificação de alterações genéticas num indivíduo. A WGS é mais trabalhosa, complexa, e dispendiosa (Boycott *et al.*, 2013). A WGS é porém significativamente mais poderosa em detetar CNV's (Copy number variations) do que a WES visto que consegue ler todo o DNA sem interrupções (que são necessárias na WES para separar a parte codificadora do genoma da parte não codificadora). A WGS apresenta também melhor qualidade de resultados (Belkadi *et al.*, 2015). Tendo isto tudo em conta, é impossível ignorar o potencial da WGS e WES para o diagnóstico de doenças no futuro. Contudo um dos grandes problemas, é a complexidade que diferentes indivíduos apresentam, que representa um obstáculo no diagnóstico de doenças de causalidade genética. Para a deteção de genes causadores de doença é necessário o mapeamento dos genes a deteção de variante e anotação. Isto é obtido comparando com bases de dados atualmente existentes prosseguindo para a posterior análise dos dados (Boycott *et al.*, 2013).

3. Bioquímica

3.1. Conceitos de Hereditariedade e Mutações

As doenças metabólicas são transferidas verticalmente de pais para filhos, sendo a maior parte delas doenças monogénicas, mendelianas, podendo ser autossómicas (não ligada aos cromossomas sexuais) ou ligadas aos cromossomas sexuais. Podem ainda ser dominantes ou recessivas. A maior parte das doenças metabólicas são autossómicas recessivas, o que significa que apenas se manifestam quando estão os dois alelos mutados, um do progenitor e outro da progenitora. Assim, se ambos os pais do indivíduo tiverem presente o alelo mutado, a probabilidade de um filho apresentar doença é de 25%. No caso em que a doença é autossómica dominante ela manifesta-se mesmo que esteja presente apenas um alelo mutado. Isto significa que a probabilidade de um indivíduo que tenha uma dessas doenças, a passar para o filho é de 50%. No entanto são poucas as doenças do metabolismo que se transmitam dessa forma (um exemplo é a hiperecplexia ou síndrome do sobressalto, uma alteração dos recetores da glicina, um neurotransmissor inibidor do sistema nervoso). Também é possível que a transmissão ocorra ligada ao cromossoma X. Também neste caso, a doença pode ser recessiva (ex. Doença de Fabry uma deficiência na enzima α -galactosidase A, presente na degradação dos esfingolípidos) ou dominantes (ex. síndrome de Rett). No caso das doenças ligadas ao X existem também casos que se encontram restritos a mulheres porque a presença da mutação do cromossoma X pode ser letal para fetos masculinos (Fig. 11).

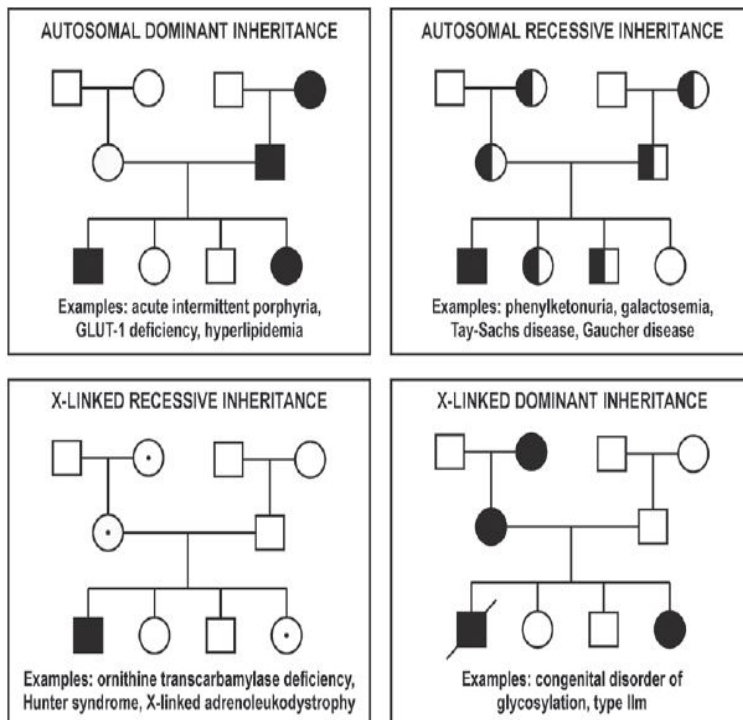


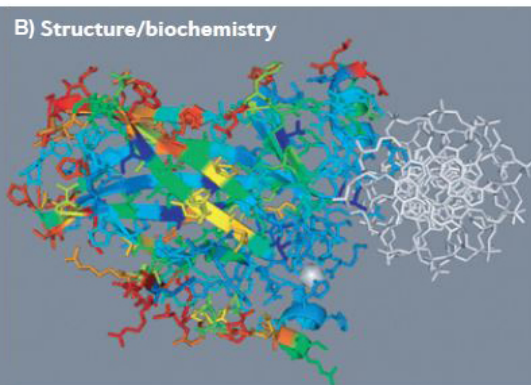
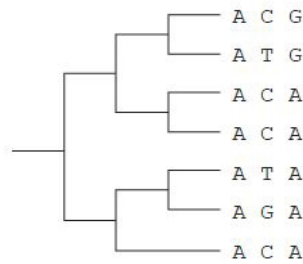
Figura 11 – Esquema das diferentes formas da transmissão das doenças, os quadrados representam os homens os círculos representam mulheres as formas que estão a preto representam indivíduos doentes, os que tem as duas cores são portadores saudáveis, os círculos com ponto representam mulheres que são portadoras do cromossoma X mutado, e o quadrado riscado, é devido ao fato que o cromossoma X mutado é letal para indivíduos masculinos. É possível observar a probabilidade de nascer um individuo com a doença (autossômica recessiva – 25%; autossômica dominante – 50%; nas mutações ligadas ao cromossoma X recessivas os homens apresentam a doença e nas ligadas ao cromossoma X dominantes, as raparigas apresentam 50% de probabilidade de ter a doença) (Wertheim-Tysarowska *et al.*, 2015).

No que toca a tipos de mutações são na maior parte dos distúrbios autossómicos recessivos mutações missense, isto significa que a enzima produzida perde grande parte da sua atividade embora não totalmente, enquanto que no caso de uma doença autossómica dominante a mutação é nonsense, grande parte das vezes, isto significa que a atividade da enzima é baixa o suficiente para nulificar a atividade na

célula, ou podem também inibir a sensibilidade do controlo em certas enzimas, fazendo com que estas entrem em hiperatividade como acontece com a síndrome do hiperinsulinismo associado a hiperamonemia (onde alterações genéticas alteram o centro alostérico da enzima glutamato desidrogenase e esta torna-se insensível à inibição pela

guanosina trifosfato) (Palladino e Stanley, 2010; Saudubray *et al.*, 2016; Wertheim-Tysarowska *et al.*, 2015). A avaliação dos efeitos de uma mutação provém do estudo da relação entre o genótipo e o fenótipo. As doenças metabólicas apresentam um espectro de fenótipos onde a relação entre a gravidade do locus afetado e o fenótipo é fraca (Lanpher *et al.*, 2006). A descoberta de mutações causadoras de doença engloba dois grandes passos: a pesquisa de alterações, o que requer a análise de vários membros da família afetados, de onde se obtêm mapas genéticos que demonstram o local do cromossoma que estava afetado, sendo esse local depois sequenciado (Weissenbach *et al.*, 1992). O problema com as doenças metabólicas é que devido à sua raridade pode apenas existir um membro da família com esta doença o que dificulta a sua identificação, para contornar esse problema o uso de tecnologias de WES ou WGS é mais procurado pois analisa o genoma como um todo permitindo a comparação com

A) Comparative genomics



C) Experimental function

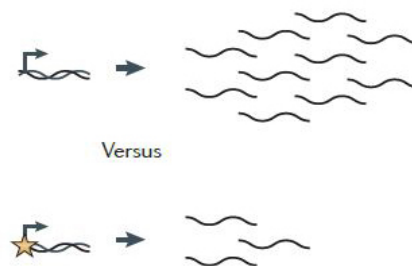


FIGURA 12 - Métodos de análise genómica para a identificação de mutações causadoras de doença. **A** – Análise genómica comparativa: uma coluna de três nucleótidos alinhados. Um é fixo (o da esquerda), um é extensamente variável (coluna média) e um levemente variável (o da coluna da direita) são então comparados os fenótipos apresentados por estes nucleótidos alterados; **B** – cristalografia de raio-X: que apresenta o impacto das substituições de aminoácidos. Essas alterações variam de fracas (a vermelho) a altas(azul) (Stone e Sidow, 2005); **C** –Avaliação de mutações no promotor de um gene através da transcrição. O promotor mutado (estrela) vai ter falha na produção de RNA (Patwardhan *et al.*, 2009). Imagem adaptada de (Cooper e Shendure, 2011).

bases de dados pré-existentes assim, como controlos internos, o que ajuda os técnicos a encontrarem, sequências suspeitas. As variações hereditárias e as variações de novo (específicas a um indivíduo) são então registadas para se passar ao segundo passo na descoberta de mutações causadoras de doenças que é a investigação da relevância fenotípica dessas alterações. As doenças metabólicas provêm de mutações que interferem com a codificação de proteínas. Devido a isto são utilizados algoritmos informáticos capazes de prever o impacto de todas as substituições para cada codão. Outros métodos utilizados são a genómica comparativa, estrutura e bioquímica, e função experimental (Fig. 12). Estes dados podem ser finalmente confirmados com o uso de modelos *in vitro* (falha de expressão ou a conformação da proteína) ou *in vivo* (usando ratos knock-out ou knock-in). Porém estes testes são evitados para análise de um grande número de variações porque são num geral caros e difíceis de realizar (Cooper e Shendure, 2011).

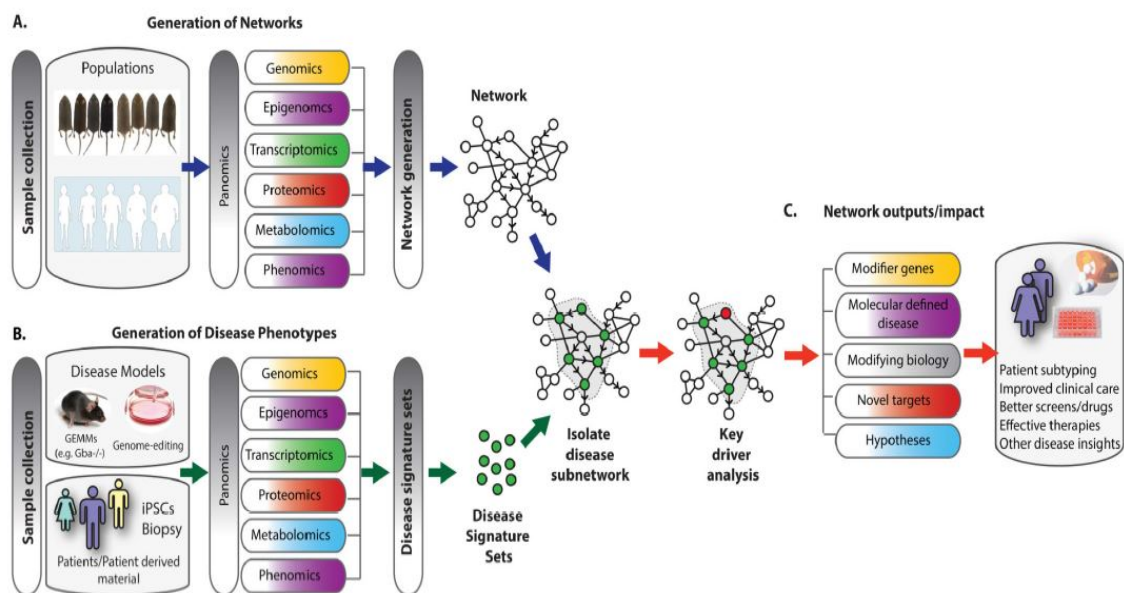


FIGURA 13 – O estudo das doenças hereditárias do metabolismo de uma perspectiva em várias escalas recorrendo a várias áreas complementares à genómica. Com estes dados é possível criar uma base de dados padrão (A) que demonstram os mecanismos normais de uma célula. Essa base é depois comparada com os dados obtidos de doentes ou por outros métodos como ratinhos ou células geneticamente modificadas, e com esses dados das várias áreas complementares à genómica é possível isolar os mecanismos da doença (B). E com isso, descobrir os elementos chave causadores da doença, que são depois associados ao gene chave desta (C). O impacto destas tecnologias não é só o conhecimento dos genes causadores da doença, mas também o melhoramento da fraca associação entre a severidade da doença e o locus mutado (Argmann *et al.*, 2016).

3.2.1.1. Apresentação Clínica

A doença de Gaucher apresenta 3 variantes distintas, nomeadamente o tipo I, II e III. A doença de Gaucher do tipo I (também chamada de doença de Gaucher não neuropática) é o tipo de doença mais prevalente na população judaica asquenaze e deve ser suspeitada quando um paciente apresenta hepatomegalia e esplenomegalia sem nenhuma razão aparente.

Representa cerca de 90% dos casos diagnosticados, sendo por isso o tipo mais vezes observado. É caracterizada por uma acumulação de glucoceramida nas células do sistema monocítico-fagocítico localizadas, especialmente, no baço, fígado, medula óssea e pulmões. Devido a isto a sintomatologia mais comum é a hepatomegalia e a

esplenomegalia, como foi descrito acima, assim como trombocitopenia, anemia normocítica e normocrômica assim como alguma neutropenia e fadiga do paciente. A infiltração de células de Gaucher na medula óssea leva a um aumento do tamanho das extremidades ósseas e a um estreitamento do restante osso, conferindo a ossos como o fémur uma forma de “*matraz de erlenmeyer*” (Fig. 15) (Clarke e Ebrary Inc., 2002; Saudubray *et al.*, 2016). Outro tipo da doença de Gaucher, o tipo II também denominado de Doença de Gaucher neuropática aguda. Este é o fenótipo mais raro e severo desta doença e pacientes afetados com ela apenas sobrevivem normalmente até aos 3 anos de vida (Sidransky, 2012). O que distingue este fenótipo do outro são as fortes alterações a nível cerebral que acontecem a nível dos astrócitos que sofrem 3 tipos de astrogliose, a



FIGURA 15 – Radiografia dos joelhos de um paciente com a doença de gaucher tipo I, onde é possível observar que um aumento do volume perto da extremidade. O que confere ao fémur a forma de matraz de erlenmeyer (Clarke e Ebrary Inc., 2002).

perivasculares, fibrilares e finalmente gemistocítica. A resposta dos astrócitos é sinal de danos cerebrais, este é um dos princípios credíveis para a patologia desta doença, contudo outro é a fraca homeostasia do íon cálcio nos neurónios. A glucoceramida aumenta a sensibilidade e potencia a ação dos recetores de rianodina, responsáveis pela passagem de cálcio e polarização dos neurónios (Futerman e Zimran, 2007). Devido aos efeitos cerebrais desta doença, pacientes que a apresentam sofrem de retroflexão do pescoço, opistótono, dificuldades de alimentação, paresia oculomotora, estrabismo. Eventualmente aparecerá a esplenomegalia e alguns casos excecionais apresentam linfo-histiocitose hemofagocítica. É importante referir que a evolução desta doença é rápida, com os pacientes a apresentarem posterior espasticidade, caquexia, escassez dos movimentos faciais, irritabilidade e problemas cognitivos (em pacientes que sobrevivem até 5 anos) (Saudubray *et al.*, 2016). Existe também a forma perinatal letal, uma variante deste fenótipo que afeta fetos e recém-nascidos que apresenta hepatomegalia, pancitopenia e hidropsia fetal (acumulação de fluído nos tecidos subcutâneos da criança). Finalmente, o terceiro fenótipo, a doença de Gaucher tipo III também chamada de Doença de Gaucher neuropática crónica funciona como um misto dos outros dois tipos. Tem um desenrolar mais lento que o tipo visto anteriormente afetando de uma forma muito menos agressiva o cérebro do indivíduo, apresentando, contudo, os efeitos da medula óssea da DG tipo I. Este fenótipo da DG é especial também porque consoante a sintomatologia que o indivíduo apresenta, é possível subdividir este tipo da DG em três subtipos (Nagral, 2014): a, b e c. O subtipo a é caracterizado pela presença de demência progressiva, ataxia e miclonia (Tuzun *et al.*, 2000). O subtipo b é caracterizado por um envolvimento a nível visceral, em que o único sintoma neuronal presente é a paralisia supranuclear da visão (a pessoa não consegue movimentar os olhos para uma determinada direção, daí compensar

com o movimento da cabeça) (Patterson *et al.*, 1993). O último subtipo é o subtipo c, é o mais raro possui também paralisia supranuclear da visão, opacidade da córnea e calcificação cardiovascular (característica particular deste subtipo) e poucos efeitos em outros órgãos (Abrahamov *et al.*, 1995).

Por fim, existe outra forma pela qual um indivíduo pode apresentar a DG, mesmo que tenha glucocerebrosidase funcional. Como dito antes, esta enzima para exercer a sua ação necessita de um co-fator, que é um composto chamado de Sap-C (Saposina C) que é uma proteína que serve como um ativador da glucocerebrosidase. Esta proteína provém da degradação de um composto denominado de prosaposina. Quando há algum problema na codificação desta proteína não ocorre formação de Sap-C. A glucocerebrosidase não é ativada, e o indivíduo desenvolve sintomatologia da DG (Tamargo *et al.*, 2012).

3.2.1.2. Genética da DG

A DG ocorre habitualmente devido a mutações no gene GBA1 responsável pela codificação da glucocerebrosidase. Existem mais de 430 mutações conhecidas neste gene sendo a mais típica a N370S. Esta mutação também altera a conformação da enzima tornando a ligação do seu ativador a Sap-C menos eficiente, isto prejudica a atividade da enzima e causa sintomatologia da DG (Tamargo *et al.*, 2012). Encontrar apenas uma única mutação N370S é premonitório do tipo 1 da DG, contudo a gravidade da doença é variável mesmo entre os indivíduos que possuem a mesma mutação (Sidransky, 2004). Outra mutação também comum é a L444P que se encontra normalmente associada aos tipos 2 e 3 desta doença, sendo que as formas mais severas desta doença estão associadas a alelos complexos originados por rearranjos genéticos (Mignot *et al.*, 2003; Saudubray *et al.*, 2016).

A prosaposina é codificada pelo gene *PSAP*. Este gene possui 15 exões e 14 intrões, responsável pela produção de saposinas A-D estando a saposina C associada à DG (Furst e Sandhoff, 1992). Foram descritas 6 mutações no gene *PSAP* na literatura e pacientes com essas mutações exibem quer as formas neuropáticas (tipo 2 ou 3) ou não neuropáticas (tipo 1) da Doença de Gaucher (Tamargo *et al.*, 2012).

3.2.1.3. Diagnóstico

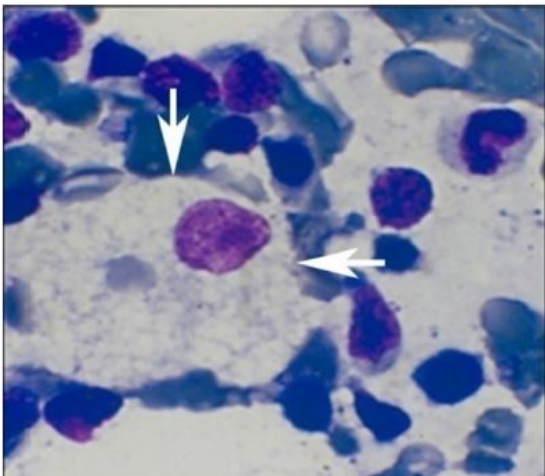


Figura 16 – Célula de Gaucher (identificada pelas setas) são macrófagos que estão carregados com glucoceramida, daí ter o citoplasma com textura de papel amassado e o núcleo excêntrico. Coloração com hematoxilina e eosina (Nagral, 2014).

Os testes de diagnóstico para esta doença passam pela análise microscópica da medula óssea para observação das células de Gaucher (Fig. 16), pela imagiologia recorrendo aos raios-X nos ossos para verificar a infiltração de células (a estrutura em matraz de erlenmeyer) assim como o uso de ecografias para avaliar o tamanho do fígado e baço (Nagral, 2014; Saudubray *et al.*, 2016).

A análise molecular representa um método de diagnóstico seguro. Pacientes que apresentem a mutação N370S não desenvolvem a forma neuropática da doença, enquanto que indivíduos que apresentem homozigotia ou heterozigotia para mutações L444P ou D409H (esta mutação está relacionada com DG tipo 3c) apresentam sintomatologia neurológica. Um problema do diagnóstico da DG tipo 3 é que como esta apresenta sintomatologia neurológica mais tardia, pode ser facilmente confundida com a DG tipo 1, problema este que é facilmente resolvido com a análise molecular. Contudo, é possível

que o indivíduo não apresente nenhuma das mutações acima referidas e mesmo assim ter sintomatologia da DG com baixos níveis de atividade da glucocerebrosidase, nestes casos é recomendado a sequenciação do gene *GBA* (Nagraal, 2014). Apesar destes testes, o principal utilizado é o estudo da atividade da Glucocerebrosidase em linfócitos/leucócitos de sangue periférico, ou em sangue seco, recorrendo ao uso de substratos de glucoceramida com cadeia curta ou fluorogênicos (Saudubray *et al.*, 2016). Para a análise da deficiência em Sap-C, como os níveis de atividade da glucocerebrosidase se encontram normais, deve-se procurar por células de Gaucher, seguindo-se a pesquisa de biomarcadores, como a quitotriosidade ou as citocinas CCL18/PARK que indicam a atividade anormal dos macrófagos, e encontram-se elevados em pacientes com sintomatologia da DG. Se o paciente apresenta estas anomalias é então recomendada a sequenciação do gene *PSAP* para análise (Saudubray *et al.*, 2016; Tyłki-Szymańska *et al.*, 2007),

3.2.2. Deficiência em Adenosina Monofosfato Desaminase 1 Muscular

3.2.2.1. Apresentação clínica

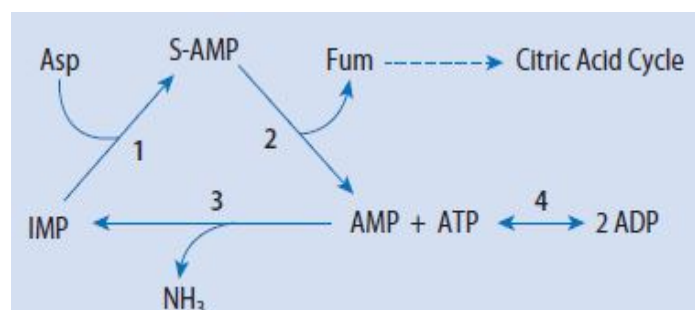


Figura 17 – O ciclo das purinas e a adenilato quinase. Ciclo que forma o fumarato (FUM), que depois entra no ciclo de Krebs (ou ciclo do ácido cítrico), a partir do aspartato. A adenosina monofosfato (AMP) é convertida em inosina monofosfato (IMP) pela adenosina monofosfato desaminase (3); o IMP é convertido a adenilsuccinato (S-AMP) pela adenilsuccinato sintetase (1) que necessita do aspartato (ASP) o adenilsuccinato é degradado em AMP e FUM pela adenil succinase (2). O AMP provém da reação de duas moléculas de adenosina difosfato (ADP) com a enzima adenilato quinase (4) que origina uma molécula de adenosina trifosfato (ATP) e AMP (Saudubray *et al.*, 2016).

Esta doença, que se apresenta em 1-2% da população caucasiana, é causada pela falta da enzima Adenosina Monofosfato Desaminase 1 (AMPD1) localizada no músculo esquelético. É responsável pela formação de fumarato que auxilia no ciclo de krebs (Fig. 17). Indivíduos que apresentem esta doença, sofrem de fraqueza muscular, fadiga, câibras e mialgia após exercício intenso. Além disso, os indivíduos mantêm-se cansados por mais tempo comparado com indivíduos saudáveis, isto acompanhado também de um aumento de creatinina cinase, mioglobínúria e erros em electromiogramas (Fishbein *et al.*, 1978).

3.2.2.2. Genética da Deficiência em AMPD1

A deficiência em AMPD1 é transmitida de forma autossómica recessiva e provém de uma alteração no gene *AMPD1* em que um dos codões origina um codão nonsense Q12X que origina uma enzima truncada e inativa. É importante também referir que em indivíduos heterozigotos embora sejam portadores, eles também exibem a atividade da AMPD1 reduzida (Morisaki *et al.*, 1992).

3.2.2.3. Diagnóstico da Deficiência em AMPD1

O despiste desta doença é realizado através de um teste de esforço com posterior análise da amónia no sangue que aumenta em indivíduos saudáveis, o que não acontece em doentes com deficiência em AMPD1. Contudo, o diagnóstico definitivo é dado através da análise genética ou então por ensaios histoquímicos e bioquímicos em tecidos obtidos por biópsia do músculo onde a atividade da AMPD deve estar abaixo dos 2% (Sabina *et al.*, 1992).

3.2.3. Deficiência de Glicosiltransferase 1 (ALG6-CDG)

3.2.3.1. Apresentação clínica

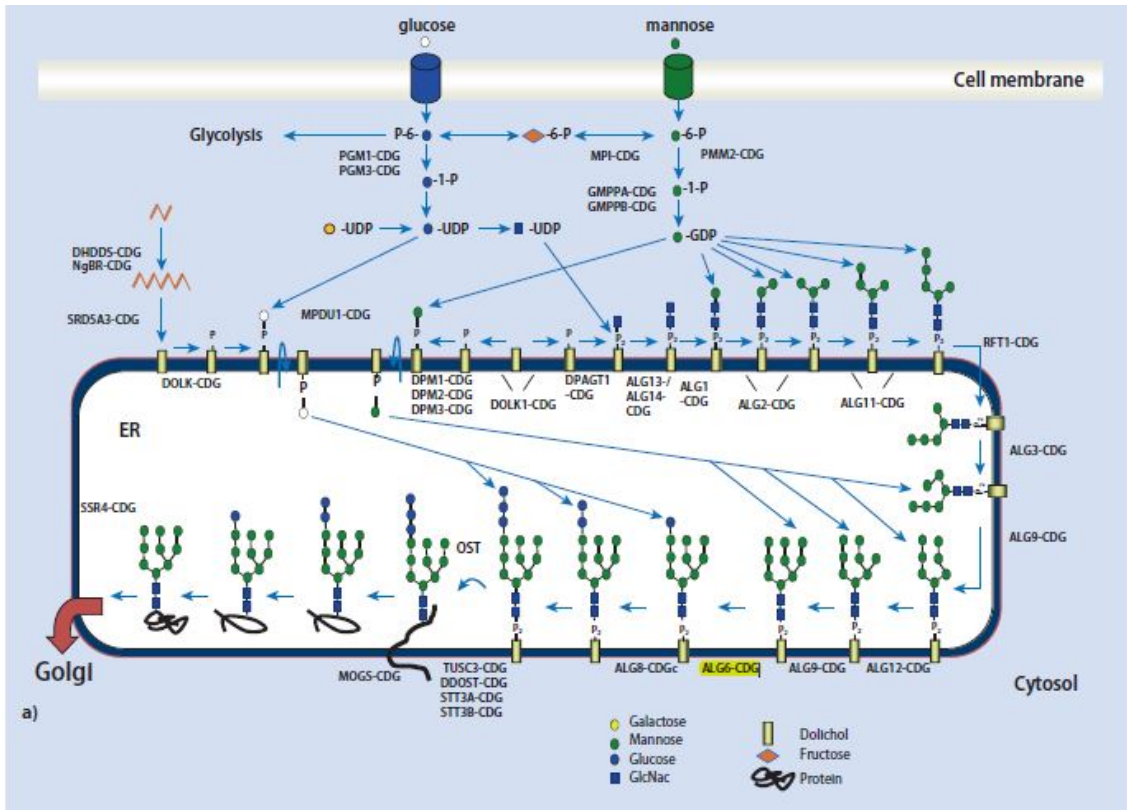


FIGURA 18 – Processo da N-glicosilação. Começa no retículo endoplasmático, com uma molécula de dolichol ao que se procede a adição de diferentes moléculas como N-acetilglucosamina₂, manose e glucose, sendo que a enzima codificada pelo gene ALG6 (a amarelo) catalisa a adição da primeira de três moléculas de glucose, a adição dessas moléculas origina o substrato perfeito para a adição posterior da proteína. O processo continua no complexo de Golgi onde ocorre a remodelação dos N-glicanos. Imagem adaptada de (Saudubray *et al.*, 2016).

A desordem congénita da glicosilação no gene ALG6 (ALG6-CDG) é a segunda doença mais comum da N-glicosilação. Alguns dos sintomas são problemas de desenvolvimento, hipotonia, ataxia, estrabismo, nistagmo e ataques. Um número elevado de doentes exibe também anomalias no esqueleto, problemas comportamentais e dismorfismo facial (Saudubray *et al.*, 2016). Os glicanos são estruturas que resultam da conjugação de hidratos de carbono com outras moléculas, como as proteínas. Estas estruturas existem na membrana das células e têm essencialmente 3 funções distintas:

moduladoras (sequestração e armazenamento de nutrientes); o reconhecimento das células vizinhas; e o reconhecimento de células estranhas (Varki e Gagneux, 2015). A ALG6-CDG afeta a ligação da primeira molécula de três de glucose ao intermediário manose₉-N-acetilglucosamina₂ ligado a uma molécula de dolicol (Fig. 18) o que causa hipoglicosilação das glicoproteínas isto é importante, pois, a adição de glucose a este intermediário torna-o no substrato perfeito para a enzima que adiciona a proteína em glicoproteínas (Saudubray *et al.*, 2016).

3.2.3.2. Genética da ALG6-CDG

Esta doença tem uma transmissão autossómica recessiva. Sendo as mutações mais comuns a p.A333V (uma mutação missense em que na posição 333 um aminoácido alanina é substituído por Valina) e a p.I299Del (Morava *et al.*, 2016).

3.2.3.3. Diagnóstico da ALG6-CDG

Para o diagnóstico definitivo desta doença são utilizados dois testes um deles é a análise de oligossacáridos ligados ao dolicol nos fibroblastos, ou então procede-se à análise genética num painel de genes ou então o WES. No primeiro teste, se a maior parte das moléculas possuírem nove moléculas de manose e duas moléculas de N-acetilglucosamina, deve-se realizar posteriormente análise genética (Saudubray *et al.*, 2016).

3.2.4. Doença do armazenamento do glicogénio tipo 0

3.2.4.1. Apresentação clínica

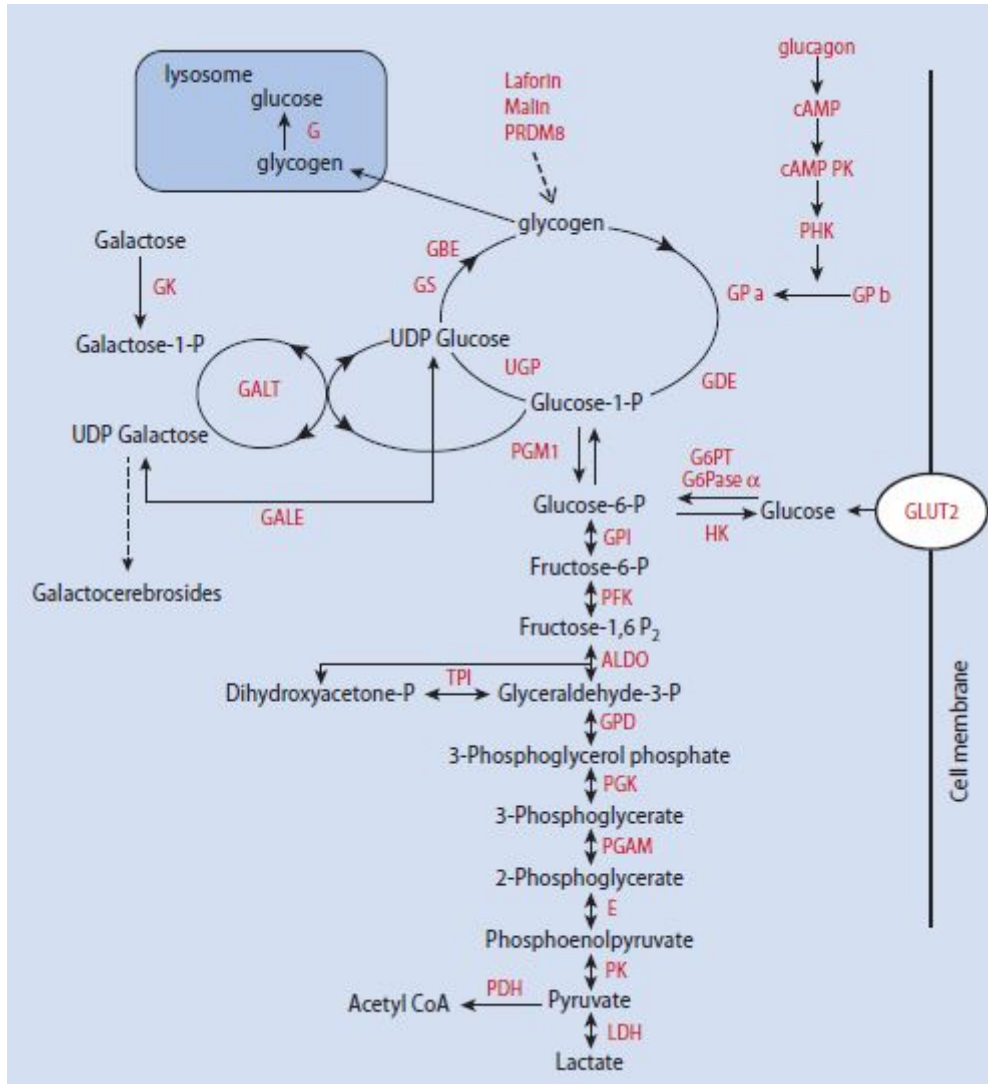


Figura 19 – Mecanismo de armazenamento da glicose sob a forma de glicogénio, a glicose entra, por exemplo, no hepatócito ou na célula muscular, através do transportador GLUT2. É então convertida e pode ser transformada em piruvato (de onde pode se obtém acetil co-enzima que segue para o Ciclo de Krebs em situação aeróbica ou então, o piruvato pode ser transformado em lactato originado também energia em situação anaeróbica). Caso não seja necessário ATP, a glicose é convertida a glicogénio (glicogénese) que fica armazenado sendo degradado no lisossoma para formar novamente glicose conforme necessidade (glicogénólise). São processos complexos que envolvem várias enzimas (a vermelho) e a falha de alguma delas causam diferentes doenças no armazenamento do glicogénio que vão desde do tipo 0 até ao tipo XV consoante a enzima que se encontra em deficiência (Saudubray *et al.*, 2016).

O glicogénio é uma molécula complexa composta por moléculas de glucose ligadas à volta de uma molécula de glicogenina e, é a forma de o organismo guardar a glucose, para ser usada mais tarde para a obtenção de energia. O processo de formação de glicogénio denomina-se glicogénese e o processo de degradação denomina-se de glicogenólise. Através da glicogenólise o glicogénio degrada-se em glucose-6-fosfato e este composto é depois usado para obter energia quer de modo aeróbico (originando Acetil-Coenzima A que entra no ciclo de Krebs) quer de modo anaeróbico (a transformação do piruvato em lactato) (Fig. 19) (Litwack, 2008).

O processamento do glicogénio é um processo complexo que envolve várias enzimas e a deficiência de alguma delas causa uma doença denominada doença do armazenamento do glicogénio (GSD). Existem diferentes tipos de GSD consoante a enzima deficiente, e os tipos vão do 0 ao tipo XV (Saudubray *et al.*, 2016). A GSD tipo 0 corresponde à deficiência da enzima glicogénio sintase (GS) responsável pela ligação da uridina difosfato glucose à glicogenina (Litwack, 2008). Pacientes com esta deficiência são assintomáticos nos primeiros anos de vida, contudo a amamentação noturna é complicada. Após esta terminar, é comum aparecer cetose hipoglicémica em jejum e irritabilidade antes do pequeno-almoço. A cetose corresponde a um aumento dos corpos cetónicos que são compostos obtidos pela degradação dos ácidos gordos e conseguem fornecer energia (nomeadamente ao cérebro), o que faz com que os indivíduos recém-nascidos com esta doença pareçam assintomáticos (Hasselbalch *et al.*, 1995; Weinstein *et al.*, 2006). Esta doença é normalmente descoberta quando o indivíduo apresenta hipoglicemia durante uma avaliação da letargia associada a doença intestinal. As crianças apresentam também fraco crescimento, hiperlipidémia, transaminases

elevadas e osteopenia e apresentam também glicosúria e hiperglicemia pós-pandrial (Bachrach *et al.*, 2002). No cérebro o glicogénio é degradado para fornecer energia durante períodos de hipoglicemia e hipoxia aos neurónios (enviando lactato a estes). A falha da GS causa que os astrócitos não obtenham energia suficientemente rápido para a eliminação do neurotransmissor glutamato (neurotransmissor excitatório) da fenda sináptica o que causa convulsões (Shulman *et al.*, 2001), devido à acumulação de corpos poliglicanos no Sistema nervoso central (Benarroch, 2010). Nos neutrófilos o glicogénio apresenta uma função importante. Daí pessoas com GSD não conseguem tão facilmente combater infeções. Por fim o glicogénio é também importante como forma de gerar energia rapidamente para os músculos em questão de milissegundos (Shulman e Rothman, 2001). Daí, a nível cardíaco, pacientes apresentam hipertrofia, maior número de fibras musculares oxidativas e fraca resistência a esforço, com casos de síncope e paragem cardíaca já reportados e a nível muscular foi descrita fraqueza muscular e mialgia (Kollberg *et al.*, 2007; Sukigara *et al.*, 2012).

3.2.4.2. Genética da GSD tipo 0

A GSD tipo 0 é causada por deficiência na enzima GS. Esta enzima é codificada pelo gene *GYS*. Existem duas isoformas da enzima GS codificadas por genes diferentes, o gene *GYS1* representa a isoforma usada no tecido muscular e o gene *GYS2* codifica a isoforma usada no fígado, sendo elas 70% homólogas uma com a outra, cada uma causa um tipo de GSD sendo que a GSD tipo 0a representa uma mutação a nível da *GYS2*, e a falha da *GYS1* causa a GSD tipo 0b. Existem diferentes mutações já descritas sendo que a mutação R246X é a mais frequente do gene *GYS2* em pessoas de origem italiana (Saudubray *et al.*, 2016). No *GYS1* foram descritas inserções de intrões (nomeadamente

o 9), deleções no exão 15 assim como pequenas mutações pontuais, (alterando o aminoácido traduzido) (Sukigara *et al.*, 2012) e também foram descritas mutações nonsense (Kollberg *et al.*, 2007).

3.2.4.3. Diagnóstico da GSD tipo 0

A GSD tipo 0a deve ser considerada quando o indivíduo apresenta sintomas de hipoglicemia cetónica, também associada a hiperglicemia e glicosúria pós-pandrial, sendo que esta doença é frequentemente mal diagnosticada. É possível fazer o diagnóstico através de análise de uma biópsia ao fígado e músculo, contudo a análise de mutações é neste momento o método de diagnóstico mais usado (devido ao facto de ser menos invasivo) (Saudubray *et al.*, 2016).

3.2.5. Desordens da Fosforilação Oxidativa

3.2.5.1. Demonstração clínica

A fosforilação oxidativa (OXPHOS) representa o passo final do catabolismo aeróbico da energia. Ocorre na mitocôndria, nomeadamente, nas cristas envolvendo várias enzimas e processos (Saudubray *et al.*, 2016). A função do OXPHOS é a oxidação e a redução de moléculas de NADH e FADH₂ tendo o oxigénio molecular como aceitador de eletrões, através de um gradiente de prótons que é gerado pelos complexos I, III e IV permitindo que o complexo V produza a maioria do ATP da célula (Fig. 20) (Hatefi, 1985). Para isso são utilizados os complexos enzimáticos I, II, III, IV e V sendo que todos eles contêm várias subunidades sendo que todos eles, exceto o complexo II, contêm subunidades codificadas pelo DNA mitocondrial (mtDNA) cuja formação requer

maquinaria complexa para a replicação, transcrição e tradução nos ribossomas mitocondriais (Smits *et al.*, 2010). São no total utilizadas mais de 200 enzimas para a produção dos complexos, não esquecendo que para o processo de OXPHOS são necessários também cofatores como a coenzima Q_{10} complexos de enxofre e ferro, grupos heme e cobre (Saudubray *et al.*, 2016). Além disso, lípidos como a cardiolipina (específico da membrana da mitocôndria) desempenha um papel essencial na formação das cristas e ativação da OXPHOS (Mayr, 2015).

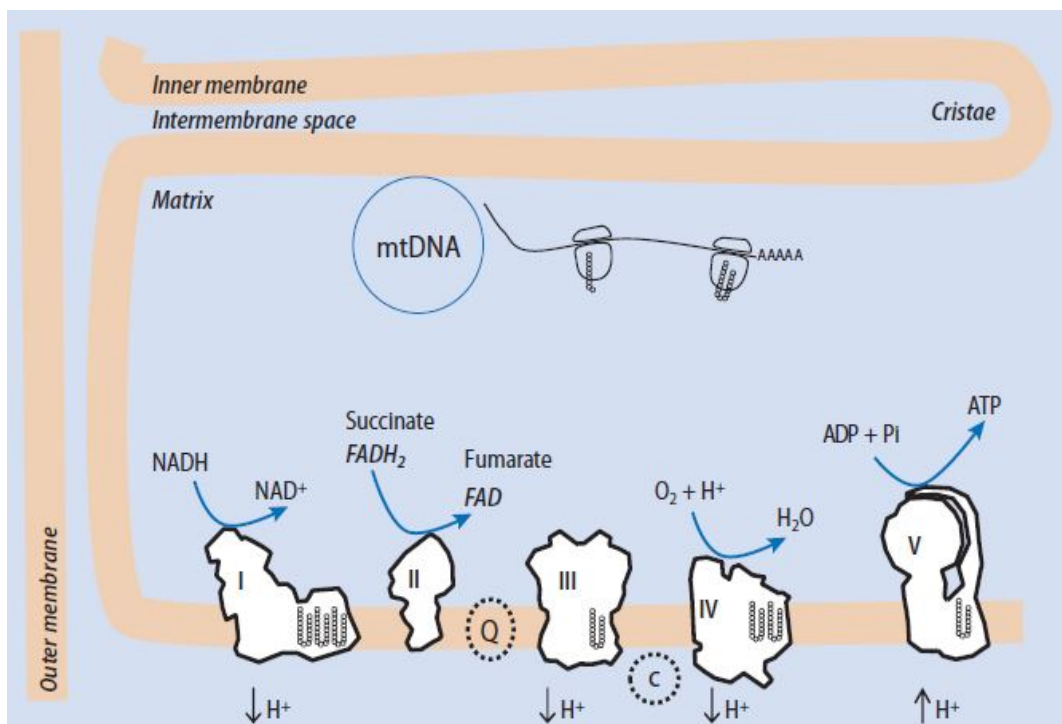


FIGURA 20 – O processo de OXPHOS, é complexo e serve para a mitocôndria obter energia sob a forma de ATP. A mitocôndria é um organelo especial devido ao fato de possuir o seu próprio DNA, o mtDNA. Algumas proteínas são formadas na matriz e outras são formadas no exterior da mitocôndria e enviadas posteriormente para o interior desta. As proteínas apresentadas são as proteínas usadas na cadeia transportadora de elétrons e envolve o complexo I (NADH desidrogenase) complexo II (succinato desidrogenase), complexo III (ubiquinol-citocromo c oxidoreductase), complexo IV (citocromo c oxidase) e o complexo V (ATP sintetase), são também utilizados co-fatores como a Co-enzima Q_{10} (Q) e o citocromo c (c). Em falta nesta imagem está o uso de agregados do ferro e enxofre (este último obtido pela cisteína) que são essenciais para o funcionamento da OXPHOS e utilizam um diverso número de enzimas para a sua formação. Falhas na formação de alguma destas proteínas e Co-fatores causam diferentes distúrbios da OXPHOS (Saudubray *et al.*, 2016).

Devido à complexidade da OXPHOS, os distúrbios destas são variados e com sintomatologia diversificada (a OXPHOS ocorre em todas as células do organismo por isso distúrbios da OXPHOS pode afetar qualquer tecido). É igualmente possível aparecer sintomatologia desde o desenvolvimento fetal até à miopatia isolada do idoso. Por isso, é possível compartimentar os problemas da OXPHOS em: apresentações neonatais e infantis como a síndrome de Leigh, síndrome de Alpers–Huttenlocher, síndrome da depleção do DNA mitocondrial, síndrome reversível da cadeia respiratória infantil; apresentações na infância e adolescência como a síndrome de Kearns-Sayre, Encefalopatia mitocondrial com acidose láctica e episódios de convulsões (MELAS), epilepsia mioclônica com fibras vermelhas esfarrapadas (MERRF), neuropatia ótica hereditária de Leber (LHON), entre outros; e apresentações no adulto das quais são exemplos a síndrome da ataxia neuropática, e a Surdez e diabetes herdados da mãe (Saudubray *et al.*, 2016).

3.2.5.2. Genética dos distúrbios da OXPHOS

Mutações do DNA mitocondrial

O mtDNA é composto por 37 genes. Não possui intrões e apenas possui uma região não codificadora (Anderson *et al.*, 1981). A falta de histonas, capacidades limitadas de reparação e a proximidade a espécies reativas de oxigénio tornam o mtDNA mais suscetível a mutações, em comparação com o DNA nuclear (Taylor e Turnbull, 2005). Existem diversas mutações que podem ocorrer no mtDNA desde de mutações pontuais, pequenos e grandes rearranjos ou a redução do número de cópias, também chamado de depleção de mtDNA. Essas mutações podem afetar a formação das

subunidades como a formação ácido ribonucleico de transferência (tRNA) e ácido ribonucleico ribossomal que causa a diminuição também de complexos de OXPHOS. Cada célula possui um elevado número de mitocôndrias. Devido a isso são possíveis os fenómenos de heteroplasmia (a presença de mitocôndrias com DNA selvagem e mutado na mesma célula) e mais raramente homoplasmia (a presença de apenas mtDNA mutado ou mtDNA selvagem) e devido a isso há habitualmente uma atividade residual presente, pelo que é necessário que a quantidade de mtDNA mutado ultrapasse um limite para uma doença se demonstrar. Há doenças que apenas aparecem em homoplasmia (ex. LHON), a maior parte delas precisam de uma carga mutante de 80-95% (ex. MELAS, MERRF). Para grandes deleções a carga mutacional é menor (50-70%) (Saudubray *et al.*, 2016). Finalmente para algumas mutações como as do anticodão de tRNA's mitocondriais a carga de mutacional é de apenas 20% (Sacconi *et al.*, 2008).

Mutações do DNA Nuclear

Mutações em cerca de 200 genes nucleares foram identificadas que resultam em defeitos da OXPHOS únicos ou combinados (Rahman, 2015). É possível dividir as mutações do DNA nuclear responsáveis pelos distúrbios da OXPHOS consoante o seu mecanismo em (Fig. 21):

- Mutações das subunidades da OXPHOS ou os seus fatores de montagem que tipicamente causam defeitos enzimáticos únicos sendo as mais frequentes os erros no complexo I e IV (Saudubray *et al.*, 2016);
- Defeitos na manutenção de mtDNA que engloba mutações de fatores necessários para a replicação assim como as enzimas envolvidas para a formação de nucleótidos necessários para a replicação (Rahman e Poulton, 2009). Estas

mutações causam deleções no mtDNA e uma acumulação destas leva a uma redução dos complexos I, III, IV e V da OXPHOS;

- Defeitos da expressão génica do mtDNA: envolve mutações no processamento do RNA, do RNA mensageiro e modificações ao tRNA que causam também diminuição da produção dos complexos enzimáticos I, III, IV V (Saudubray *et al.*, 2016). Dentro desta categoria também temos os defeitos da tradução mitocondrial que engloba as mutações dos ribossomas, na aminoacil-tRNA sintetase e os fatores necessários para a iniciação, alongação e regulação do processo de tradução;
- Defeitos nos cofatores e na sua biossíntese: que engloba defeitos na biossíntese e no transporte de fatores como a Coenzima Q₁₀ os agregados de ferro e enxofre, riboflavina, grupo heme, cobre e ferro (Smits *et al.*, 2010);
- Defeitos da membrana mitocondrial: representam um grupo de mutações em expansão, inclui mutações como a *TAZ*, *AGK* e *SERAC1* que causam síndrome de Barth, Sengers e MEGDEL respetivamente (Mayr, 2015)
- Metabolitos tóxicos: provenientes das diferentes vias metabólicas da mitocôndria estes metabolitos podem causar problemas de um ou vários complexos da OXPHOS (Tiranti *et al.*, 2009).

Todas estas mutações do DNA e do mtDNA podem ser transmitidas autossomicamente (recessivo ou dominante) ou ligadas ao cromossoma X e quando assim são podem ter três padrões de manifestação: (1) apenas as fêmeas apresentam, sendo a mutação letal para embriões macho (ex. *NDUFB11*); (2) a doença ocorre nos dois sexos (ex. *HSD17B10*); (3) a doença aparece apenas em machos ou com as fêmeas a apresentarem sintomatologia leve (ex. *NDUFA1*) (Saudubray *et al.*, 2016).

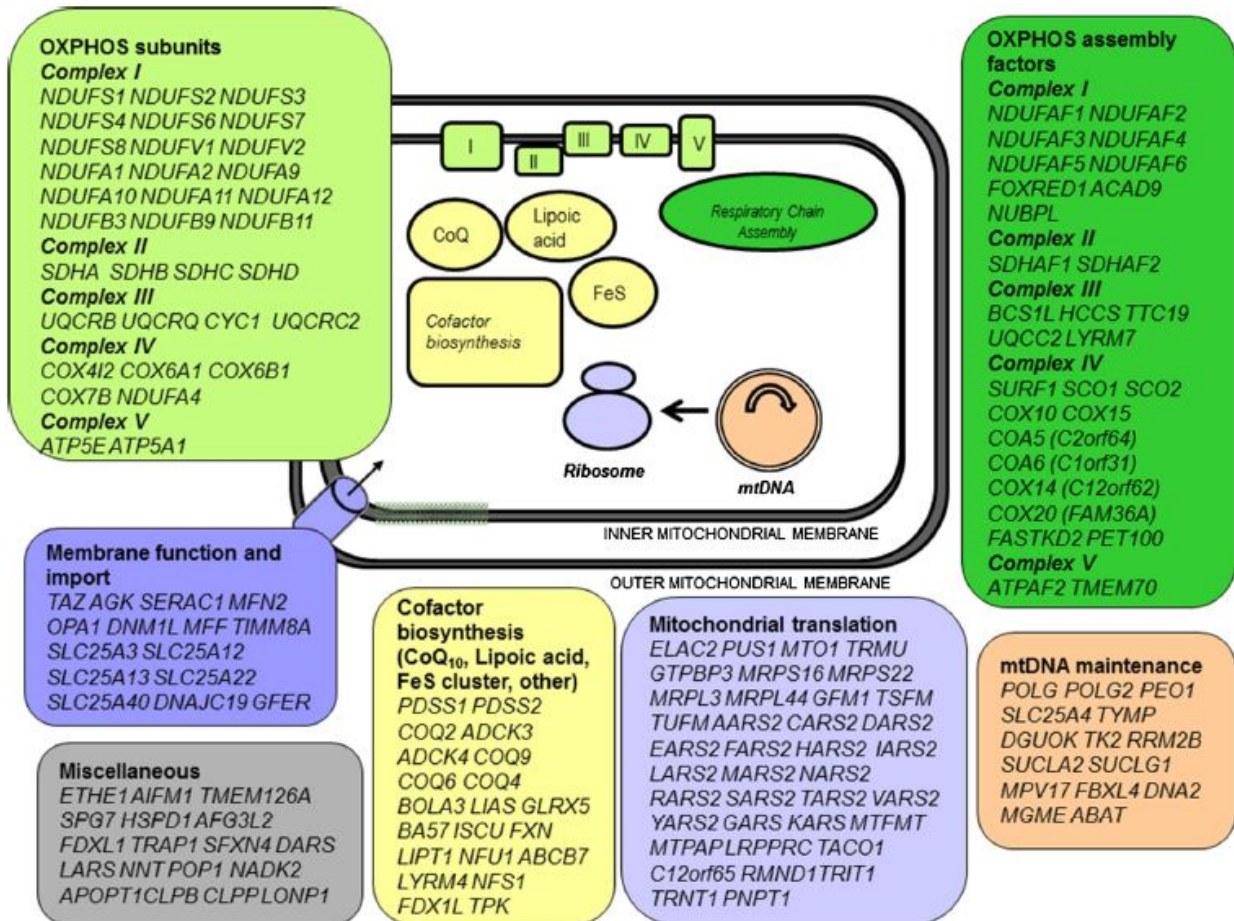


Figura 21 – Nomenclatura das principais mutações nucleares que causam distúrbios da OXPHOS, que estão divididas consoante o seu mecanismo onde é possível de se observar a complexidade da interação entre o DNA e o mtDNA, o DNA nuclear é necessário para a formação das subunidades da OXPHOS(verde claro), para a sua montagem(verde escuro), funcionamento da membrana e a importação de compostos(azul), na biossíntese de cofatores(amarelo), tradução de mtDNA (azul claro) e a manutenção deste(laranja), por último outras mutações diversas(cinza) também causam defeitos na OXPHOS (Rahman, 2015).

3.2.5.3. Diagnóstico das desordens da OXPHOS

Devido ao número variado de tecidos que podem ser afetados pelas desordens da OXPHOS e à presença de atividade residual, o diagnóstico destas doenças é complicado. O diagnóstico deve começar pelo estudo da família com avaliação do historial clínico devendo posteriormente realizar-se análises clínicas precisas como os testes metabólicos e de rastreio. Estudos funcionais das enzimas do OXPHOS nos tecidos através de biopsias deverá ser a última etapa ou, realizada em paralelo mas apenas em doentes com doença aguda (Saudubray *et al.*, 2016). Deve-se também realizar, se possível, WES ou WGS o mais cedo possível (Haack *et al.*, 2012). Esta é a melhor técnica para análise devido ao facto de as doenças mitocondriais estarem associadas a um elevado número de diferentes defeitos genéticos como por exemplo a doença de Leigh que se encontra associada a mais de 75 genes (Lake *et al.*, 2016). O WES é uma ferramenta indispensável para traçar o perfil genético, embora alguns centros usem Sequenciação de Próxima Geração (que engloba as técnicas de sequenciação de 2º, 3º e 4º geração) de um largo número de genes como o “MitoExome”. Apesar de a análise dos dados ser complicada, esse problema diminuirá com o aumento da disponibilidade de sequências controlo e de pacientes. Para a análise de grandes deleções ou rearranjos no mtDNA técnicas como o qPCR ou o dPCR são as mais recomendadas devendo para isso ser usada uma amostra de um tecido relevante como o músculo (Saudubray *et al.*, 2016).

4. Conclusão

A causalidade das doenças é algo que é imensamente investigado, dado que ao descobrir o que causa a doença é possível alargar o conhecimento sobre os mecanismos desta, assim como novas formas de diagnóstico e tratamento. Este tipo de conhecimento e tecnologia tem assentado cada vez mais nas técnicas genéticas, pois estas permitem fazer o diagnóstico e identificação da doença com extrema sensibilidade e especificidade, o que não acontece noutras técnicas. As técnicas genéticas têm facilmente diagnosticado novos casos, permitindo a investigação de novos genes passíveis de causar doença. De todas as técnicas é possível destacar a sequenciação nomeadamente a WGS e a WES. Estas duas tecnologias são de momento a vanguarda das técnicas genéticas e representam o maior potencial de diagnóstico. Embora a quantidade de dados provenientes destas tecnologias seja imensa e o seu tratamento complicado, é impossível negar o poder que apresentam na identificação de novas mutações e a nível de diagnóstico. Desenvolvimentos destas tecnologias permitem a evolução não só nos ramos da investigação e diagnóstico, mas também no desenvolvimento de medicina personalizada específica para o doente. Outra técnica de PCR a destacar é a PCR digital que é a técnica mais sensível e específica disponível até agora permitindo quantificar a expressão de um determinado gene identificando também a sua presença em quantidades mínimas. As doenças do metabolismo podem afetar diferentes gerações de famílias, podem ser transmitidas e herdadas de diferentes formas e podem afetar todos os tecidos do corpo não estando confinadas a um tecido específico. No organismo humano existem milhares de enzimas cuja deficiência causa uma doença com sintomatologia mais ou menos grave. A identificação de genes causadores destas doenças sempre foi um desafio para a comunidade científica, visto o baixo número de indivíduos que a possuem, o que não

permite bons estudos. As técnicas genéticas devem ser cada vez mais utilizadas para este fim, devido à sua sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de doenças hereditárias do metabolismo. À medida que novas mutações são identificadas estas podem ser diagnosticadas com recurso às técnicas de PCR tornando-as o método diagnóstico padrão, obtendo-se assim o diagnóstico precoce. Na investigação as técnicas genéticas permitem proceder à descoberta de genes passíveis de originar a doença, o que permite aos investigadores fazer uma análise da mutação, identificar o seu efeito na enzima em questão, visualizar a enzima mutada, através de cristalografia de raio-X e finalmente utilizando modelos animais (por ex. ratos *knock-in* ou *knock-out*) verificar se estes exprimem a mesma doença que o indivíduo. Com isto, fica confirmado que a mutação é causadora da doença e, a partir desse ponto, é possível diagnosticá-la recorrendo às técnicas de PCR. A importância das técnicas genéticas na investigação provém então da identificação de todas as mutações passíveis de causar doença.

Resumindo, as técnicas genéticas apresentam um elevado poder de diagnóstico e auxiliam na investigação de doenças raras como as doenças hereditárias do metabolismo. Posto isto, a tecnologia continua ainda muito dispendiosa, trabalhosa e de difícil acesso, contudo, a ciência e a técnica continuam sempre em evolução e as técnicas genéticas não são exceção, no futuro estas técnicas estarão mais rápidas, de fácil acesso a toda a população, menos complexas e dispendiosas, tornando as técnicas genéticas um bem essencial não só nos erros hereditários do metabolismo como em muitas outras doenças.

5. Bibliografia

- Abrahamov, A.; Elstein, D.; Zimran, A., *et al.* (1995). Gaucher's disease variant characterised by progressive calcification of heart valves and unique genotype. *The Lancet*, 346, pp. 1000-1003.
- Anderson, S.; Bankier, A. T.; Barrell, B. G., *et al.* (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290, pp. 457-65.
- Ansorge, W. J.; Katsila, T. e Patrinos, G. P. (2017). Chapter 8 - Perspectives for Future DNA Sequencing Techniques and Applications. *Molecular Diagnostics (Third Edition)*. Academic Press pp. 141-153.
- Argmann, C. A.; Houten, S. M.; Zhu, J., *et al.* (2016). A Next Generation Multiscale View of Inborn Errors of Metabolism. *Cell Metab*, 23, pp. 13-26.
- Bachrach, B. E.; Weinstein, D. A.; Orho-Melander, M., *et al.* (2002). Glycogen synthase deficiency (glycogen storage disease type 0) presenting with hyperglycemia and glucosuria: report of three new mutations. *J Pediatr*, 140, pp. 781-3.
- Banka, S.; Blom, H. J.; Walter, J., *et al.* (2011). Identification and characterization of an inborn error of metabolism caused by dihydrofolate reductase deficiency. *Am J Hum Genet*, 88, pp. 216-25.
- Bartlett, J. M. S. e Stirling, D. (2003). *PCR protocols*. Totowa, Humana Press.
- Belkadi, A.; Bolze, A.; Itan, Y., *et al.* (2015). Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, pp. 5473-8.
- Benarroch, E. E. (2010). Glycogen metabolism: metabolic coupling between astrocytes and neurons. *Neurology*, 74, pp. 919-23.
- Berg, H.; Ziegler, K.; Piotukh, K., *et al.* (2000). Biosynthesis of the cyanobacterial reserve polymer multi - L - arginyl - poly - L - aspartic acid (cyanophycin). *European Journal of Biochemistry*, 267, pp. 5561-5570.
- Biassoni, R.; Raso, A. e Springerlink (Online Service) (2014). Quantitative Real-Time PCR Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology, Methods and Protocols*,.
- Biesecker, L. G.; Shianna, K. V. e Mullikin, J. C. (2011). Exome sequencing: the expert view. *Genome Biol*, 12, pp. 128.
- Biorad Inc. (2006). *Real-Time PCR: Applications Guide*. California, Biorad Inc.
- Bizouarn, F. (2004). Introduction to Digital PCR. In: Biassoni, R. e Raso, A. (eds.) *Quantitative Real-Time PCR Methods and Protocols*. London Humana Press pp. 27-41.
- Boycott, K. M.; Vanstone, M. R.; Bulman, D. E., *et al.* (2013). Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. *Nat Rev Genet*, 14, pp. 681-91.
- Boyd, S. D. (2013). Diagnostic applications of high-throughput DNA sequencing. *Annual Review Pathology*, 8, pp. 381-410.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25, pp. 169-93.
- Butchbach, M. E. (2016). Applicability of digital PCR to the investigation of pediatric-onset genetic disorders. *Biomol Detect Quantif*, 10, pp. 9-14.
- Camunas-Soler, J.; Lee, H.; Hudgins, L., *et al.* (2017). Noninvasive prenatal diagnosis of single-gene disorders using droplet digital PCR. *bioRxiv*, pp.

- Chang, J. G.; Liu, H. J.; Huang, J. M., *et al.* (1997). Multiplex mutagenically separated PCR: diagnosis of beta-thalassemia and hemoglobin variants. *Biotechniques*, 22, pp. 520-7.
- Cheadle, J.; Myring, J.; Al-Jader, L., *et al.* (1992). Mutation analysis of 184 cystic fibrosis families in Wales. *J Med Genet*, 29, pp. 642-6.
- Cherf, G. M.; Lieberman, K. R.; Rashid, H., *et al.* (2012). Automated forward and reverse ratcheting of DNA in a nanopore at 5-A precision. *Nat Biotechnol*, 30, pp. 344-8.
- Clarke, J.; Wu, H. C.; Jayasinghe, L., *et al.* (2009). Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nat Nanotechnol*, 4, pp. 265-70.
- Clarke, J. T. R. e Ebrary Inc. (2002). A clinical guide to inherited metabolic diseases. 2nd ed. Cambridge, U.K. ; New York: Cambridge University Press,.
- Coleman, W. B. e Tsongalis, G. J. (2006). Molecular diagnostics for the clinical laboratorian. 2nd ed. Humana Press: Totowa, N. J.
- Cooper, G. M. e Shendure, J. (2011). Needles in stacks of needles: finding disease-causal variants in a wealth of genomic data. *Nat Rev Genet*, 12, pp. 628-40.
- Day, E.; Dear, P. H. e Mccaughan, F. (2013). Digital PCR strategies in the development and analysis of molecular biomarkers for personalized medicine. *Methods*, 59, pp. 101-7.
- Dong, H. e Wang, S. (2012). Exploring the cancer genome in the era of next-generation sequencing. *Front Med*, 6, pp. 48-55.
- Dorak, M. T. (2006). *Real-time PCR*. New York ; Abingdon England, Taylor & Francis.
- Dube, S.; Qin, J. e Ramakrishnan, R. (2008). Mathematical Analysis of Copy Number Variation in a DNA Sample Using Digital PCR on a Nanofluidic Device. *PLOS ONE*, 3, pp. e2876.
- Eid, J.; Fehr, A.; Gray, J., *et al.* (2009). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*, 323, pp. 133-8.
- Elshaari, F. A.; Sheriff, D. S.; Agela, A. E., *et al.* (2013). Screening for Inborn Errors of Metabolism. *International Journal of Biomedicine*, 3, pp. 211-214.
- Evans, M. F. (2009). The polymerase chain reaction and pathology practice. *Diagnostic Histopathology*, 15, pp. 344-356.
- Fishbein, W.; Armbrustmacher, V. e Griffin, J. (1978). Myoadenylate deaminase deficiency: a new disease of muscle. *Science*, 200, pp. 545-548.
- Fuchs, J.; Podda, M. e Ebrary Inc. (2005). Encyclopedia of medical genomics and proteomics. New York: Dekker.
- Furst, W. e Sandhoff, K. (1992). Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipid catabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1126, pp. 1-16.
- Futerman, A. H. e Zimran, A. (2007). *Gaucher disease*. Boca Raton, CRC/Taylor & Francis.
- Haack, T. B.; Haberberger, B.; Frisch, E. M., *et al.* (2012). Molecular diagnosis in mitochondrial complex I deficiency using exome sequencing. *J Med Genet*, 49, pp. 277-83.
- Hasselbalch, S. G.; Knudsen, G. M.; Jakobsen, J., *et al.* (1995). Blood-brain barrier permeability of glucose and ketone bodies during short-term starvation in humans. *Am J Physiol*, 268, pp. E1161-6.
- Hatefi, Y. (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem*, 54, pp. 1015-69.

- Hayatsu, H. (2008). The bisulfite genomic sequencing used in the analysis of epigenetic states, a technique in the emerging environmental genotoxicology research. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 659, pp. 77-82.
- Henegariu, O.; Heerema, N. A.; Dlouhy, S. R., *et al.* (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*, 23, pp. 504-511.
- Hindson, B. J.; Ness, K. D.; Masquelier, D. A., *et al.* (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem*, 83, pp. 8604-10.
- Innis, M. A.; Gelfand, D. H. e Sninsky, J. J. (1990). *PCR protocols : a guide to methods and applications*. San Diego, Academic Press.
- Innis, M. A.; Myambo, K. B.; Gelfand, D. H., *et al.* (1988). DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, pp. 9436-40.
- Item, C. B.; Stockler-Ipsiroglu, S.; Stromberger, C., *et al.* (2001). Arginine:glycine amidinotransferase deficiency: the third inborn error of creatine metabolism in humans. *Am J Hum Genet*, 69, pp. 1127-33.
- Joshi, M. e Deshpande, J. D. (2010). Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. *International Journal of Biomedical Research*, pp. 81-97.
- Kebelmann-Betzing, C.; Seeger, K.; Dragon, S., *et al.* (1998). Advantages of a new Taq DNA polymerase in multiplex PCR and time-release PCR. *Biotechniques*, 24, pp. 154-8.
- Keer, J. T. e Birch, L. (2008). *Essentials of nucleic acid analysis a robust approach*. Cambridge, UK, Royal Society of Chemistry.
- Kennedy, S. e Oswald, N. (2011). *PCR troubleshooting and optimization : the essential guide*. Norfolk, UK, Caister Academic Press.
- Kircher, M. e Kelso, J. (2010). High-throughput DNA sequencing--concepts and limitations. *Bioessays*, 32, pp. 524-36.
- Kollberg, G.; Tulinius, M.; Gilljam, T., *et al.* (2007). Cardiomyopathy and exercise intolerance in muscle glycogen storage disease 0. *N Engl J Med*, 357, pp. 1507-14.
- Kumar, A. e Garg, N. (2005). *Genetic engineering*. New York, Nova Biomedical Books.
- Lake, N. J.; Compton, A. G.; Rahman, S., *et al.* (2016). Leigh syndrome: One disorder, more than 75 monogenic causes. *Ann Neurol*, 79, pp. 190-203.
- Lanpher, B.; Brunetti-Pierri, N. e Lee, B. (2006). Inborn errors of metabolism: the flux from Mendelian to complex diseases. *Nat Rev Genet*, 7, pp. 449-60.
- Lawyer, F. C.; Stoffel, S.; Saiki, R. K., *et al.* (1989). Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J Biol Chem*, 264, pp. 6427-37.
- Litwack, G. (2008). *Human biochemistry and disease*. Amsterdam ; Boston, Elsevier.
- Loit, E.; Tricco, A. C.; Tsouros, S., *et al.* (2011). Pre-analytic and analytic sources of variations in thiopurine methyltransferase activity measurement in patients prescribed thiopurine-based drugs: A systematic review. *Clinical Biochemistry*, 44, pp. 751-757.
- Mao, F.; Leung, W. Y. e Xin, X. (2007). Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnol*, 7, pp. 76.
- Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 9, pp. 387-402.

- Matern, D. e Rinaldo, P. (1993). Medium-Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency. *In: Pagon, R. A.; Adam, M. P.; Ardinger, H. H., et al. (eds.) GeneReviews(R)*. Seattle (WA): pp.
- Mayr, J. A. (2015). Lipid metabolism in mitochondrial membranes. *J Inherit Metab Dis*, 38, pp. 137-44.
- Mcpherson, M. J. e Møller, S. G. (2006). *PCR*. New York, Taylor & Francis.
- Meuer, S.; Wittwer, C. e Nakagawara, K.-I. (2001). *Rapid Cycle Real-Time PCR Methods and Applications*. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg,.
- Mignot, C.; Gelot, A.; Bessieres, B., et al. (2003). Perinatal-lethal Gaucher disease. *Am J Med Genet A*, 120A, pp. 338-44.
- Millington, D. S. (2008). Rapid and Effective Screening for Lysosomal Storage Disease: How Close Are We? *Clinical Chemistry*, 54, pp. 1592-1594.
- Morava, E.; Tiemes, V.; Thiel, C., et al. (2016). ALG6-CDG: a recognizable phenotype with epilepsy, proximal muscle weakness, ataxia and behavioral and limb anomalies. *J Inherit Metab Dis*, 39, pp. 713-23.
- Morisaki, T.; Gross, M.; Morisaki, H., et al. (1992). Molecular basis of AMP deaminase deficiency in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, pp. 6457-61.
- Morrison, C.; Trump, D. e Nowak, J. A. (2015). How Will the "\$1,000 Dollar Genome" Meet Reality (and Centers for Medicare & Medicaid Services)? *Arch Pathol Lab Med*, 139, pp. 581-582.
- Munroe, D. J. e Harris, T. J. R. (2010). Third-generation sequencing fireworks at Marco Island. *Nat Biotech*, 28, pp. 426-428.
- Nagral, A. (2014). Gaucher disease. *J Clin Exp Hepatol*, 4, pp. 37-50.
- Newton, C. R.; Graham, A.; Heptinstall, L. E., et al. (1989). Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research*, 17, pp. 2503-2516.
- Niedringhaus, T. P.; Milanova, D.; Kerby, M. B., et al. (2011). Landscape of next-generation sequencing technologies. *Anal Chem*, 83, pp. 4327-41.
- Palladino, A. A. e Stanley, C. A. (2010). The hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome. *Rev Endocr Metab Disord*, 11, pp. 171-8.
- Pasternak, J. J. (2002). *An introduction to human molecular genetics: mechanisms of inherited diseases*. São Paulo.
- Patterson, M. C.; Horowitz, M.; Abel, R. B., et al. (1993). Isolated horizontal supranuclear gaze palsy as a marker of severe systemic involvement in Gaucher's disease. *Neurology*, 43, pp. 1993-7.
- Patwardhan, R. P.; Lee, C.; Litvin, O., et al. (2009). High-resolution analysis of DNA regulatory elements by synthetic saturation mutagenesis. *Nat Biotechnol*, 27, pp. 1173-5.
- Pekin, D.; Skhiri, Y.; Baret, J.-C., et al. (2011). Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab on a Chip*, 11, pp. 2156-2166.
- Pelt-Verkuil, E. V.; Belkum, A. V. e Hays, J. P. (2008). *Principles and technical aspects of PCR amplification*. Dordrecht, Springer.
- Rahman, S. (2015). Emerging aspects of treatment in mitochondrial disorders. *J Inherit Metab Dis*, 38, pp. 641-53.
- Rahman, S. e Poulton, J. (2009). Diagnosis of mitochondrial DNA depletion syndromes. *Arch Dis Child*, 94, pp. 3-5.

- Sabina, R. L.; Fishbein, W. N.; Pezeshkpour, G., *et al.* (1992). Molecular analysis of the myoadenylate deaminase deficiencies. *Neurology*, 42, pp. 170-9.
- Sacconi, S.; Salvati, L.; Nishigaki, Y., *et al.* (2008). A functionally dominant mitochondrial DNA mutation. *Hum Mol Genet*, 17, pp. 1814-20.
- Saudubray, J.-M.; Baumgartner, M. R.; Walter, J., *et al.* (2016). *Inborn Metabolic Diseases Diagnosis and Treatment*. 6th ed.
- Schaffer, A. (2012). *Nanopore Sequencing* [Em linha]. Disponível em <http://www2.technologyreview.com/news/427677/nanopore-sequencing/> [Consultado em 20/05/ 2017].
- Shendure, J. e Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*, 26, pp. 1135-45.
- Shulman, R. G.; Hyder, F. e Rothman, D. L. (2001). Cerebral energetics and the glycogen shunt: neurochemical basis of functional imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, pp. 6417-22.
- Shulman, R. G. e Rothman, D. L. (2001). The “glycogen shunt” in exercising muscle: A role for glycogen in muscle energetics and fatigue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, pp. 457-461.
- Sidransky, E. (2004). Gaucher disease: complexity in a "simple" disorder. *Molecular Genetics and Metabolism*, 83, pp. 6-15.
- Sidransky, E. (2012). Gaucher disease: insights from a rare Mendelian disorder. *Discov Med*, 14, pp. 273-81.
- Smits, P.; Smeitink, J. e Van Den Heuvel, L. (2010). Mitochondrial translation and beyond: processes implicated in combined oxidative phosphorylation deficiencies. *J Biomed Biotechnol*, 2010, pp. 737385.
- Sokolova, J.; Janosikova, B.; Terwilliger, J. D., *et al.* (2001). Cystathionine beta-synthase deficiency in Central Europe: discrepancy between biochemical and molecular genetic screening for homocystinuric alleles. *Hum Mutat*, 18, pp. 548-9.
- Solomon, B. D.; Nguyen, A. D.; Bear, K. A., *et al.* (2013). Clinical genomic database. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, pp. 9851-5.
- Stockler, S.; Isbrandt, D.; Hanefeld, F., *et al.* (1996). Guanidinoacetate methyltransferase deficiency: the first inborn error of creatine metabolism in man. *Am J Hum Genet*, 58, pp. 914-22.
- Stone, E. A. e Sidow, A. (2005). Physicochemical constraint violation by missense substitutions mediates impairment of protein function and disease severity. *Genome Res*, 15, pp. 978-86.
- Strachan, T. e Read, A. (2011). *Human molecular genetics*. New York, Garland Science.
- Sukigara, S.; Liang, W. C.; Komaki, H., *et al.* (2012). Muscle glycogen storage disease 0 presenting recurrent syncope with weakness and myalgia. *Neuromuscul Disord*, 22, pp. 162-5.
- Tamargo, R. J.; Velayati, A.; Goldin, E., *et al.* (2012). The role of saposin C in Gaucher disease. *Mol Genet Metab*, 106, pp. 257-63.
- Taylor, R. W. e Turnbull, D. M. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*, 6, pp. 389-402.
- Tiranti, V.; Viscomi, C.; Hildebrandt, T., *et al.* (2009). Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy. *Nat Med*, 15, pp. 200-5.
- Turnpenny, P. D. e Ellard, S. (2007). *Emery's elements of medical genetics*. Edinburgh ; New York, Elsevier/Churchill Livingstone.

- Tuzun, E.; Baykan, B.; Gurses, C., *et al.* (2000). Longterm follow-up of electroencephalographic and clinical findings of a case with Gaucher's disease type 3a. *Seizure*, 9, pp. 469-72.
- Tylki-Szymańska, A.; Czartoryska, B.; Vanier, M. T., *et al.* (2007). Non-neuronopathic Gaucher disease due to saposin C deficiency. *Clinical Genetics*, 72, pp. 538-542.
- Varki, A. e Gagneux, P. (2015). Biological Functions of Glycans. *In: Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D., et al.* (eds.) *Essentials of Glycobiology*. 3rd ed. Cold Spring Harbor (NY): pp.
- Weinstein, D. A.; Correia, C. E.; Saunders, A. C., *et al.* (2006). Hepatic glycogen synthase deficiency: an infrequently recognized cause of ketotic hypoglycemia. *Mol Genet Metab*, 87, pp. 284-8.
- Weissenbach, J.; Gyapay, G.; Dib, C., *et al.* (1992). A second-generation linkage map of the human genome. *Nature*, 359, pp. 794-801.
- Wertheim-Tysarowska, K.; Gos, M.; Sykut-Cegielska, J., *et al.* (2015). Genetic analysis in inherited metabolic disorders--from diagnosis to treatment. Own experience, current state of knowledge and perspectives. *Dev Period Med*, 19, pp. 413-31.