



O papel dos produtos do gene RPGR na retinite pigmentosa

Tema nº 3

Este trabalho foi realizado por:

- António José Figueira (aluno nº 47773, Mest. Bioquímica)
- João Mendonça da Luz (aluno nº 47754, Mest. Bioquímica)

Índice

Introdução.....	2
Retinite pigmentosa.....	3
Retina, visão e transdução de estímulos visuais.....	3
Aspetos pato-fisiológicos na retinite pigmentosa.....	5
Bases genéticas da doença e papel da RPGR.....	6
Modulação do <i>splicing</i> do gene RPGR.....	12
Referências.....	13

Introdução

Os vários mecanismos moleculares associados ao controlo da expressão do potencial genético de uma célula são fundamentais para a sua homeostasia e para o desempenho das suas funções. Desregulações nestes mecanismos estão usualmente implicados em diversas patologias e problemáticas associadas, tal como no caso da retinite pigmentosa (RP) – uma doença que afeta a retina e em particular a sua capacidade de receber e processar os estímulos visuais. Muitas vezes, o processamento de RNA via *splicing* alternativo resulta em produtos génicos anormais, que podem estar, por sua vez, na base de patologias, como no caso da RP. Neste trabalho, iremos explorar o caso particular de um destes genes – o regulador GTPase da retinite pigmentosa (RPGR) – cujas formas anormais de *splicing* contribuem para o aparecimento e desenvolvimento da RP. Em resumo, o nosso trabalho exorta a importância particular do *splicing* como elemento regulador da expressão génica e potencial causador de doença, assim como de que modo a compreensão das bases moleculares das patologias podem direcionar e promover o aparecimento de novas terapias.

Retina, visão e transdução de estímulos visuais

O olho humano é uma estrutura anatômica altamente especializada constituída por diferentes tipos de células que permitem a transdução de estímulos visuais (recebidos como radiação electromagnética na gama do visível) em estímulos elétricos, que podem ser então interpretados pelo cérebro. De entre os vários componentes do olho, destaca-se o papel da retina, localizada na parte interna do globo ocular. Em termos simplistas, a retina é composta por 3 tipos de células distintas – os fotorreceptores (como os bastonetes e os cones), cuja principal função é captar a luz que chega ao olho, as células bipolares e as células nervosas ganglionares, das quais os axónios formam o nervo óptico (figura 1) (Ludwig & Cxyz, 2019). Os bastonetes são particularmente importantes no processo da visão noturna, porque regulam a excitabilidade das células bipolares e, por conseguinte, das células ganglionares em condições de fraca luminosidade. Já os cones contribuem maioritariamente para a acuidade visual diurna. A transdução de sinal que ocorre nestas células é, contudo, muito semelhante. De forma basal (na ausência de estímulo), os bastonetes/cones secretam glutamato (um aminoácido neurotransmissor) que mantém as células bipolares hiperpolarizadas. Como veremos de seguida, a percepção de luz tem por consequência última a diminuição da secreção de glutamato.

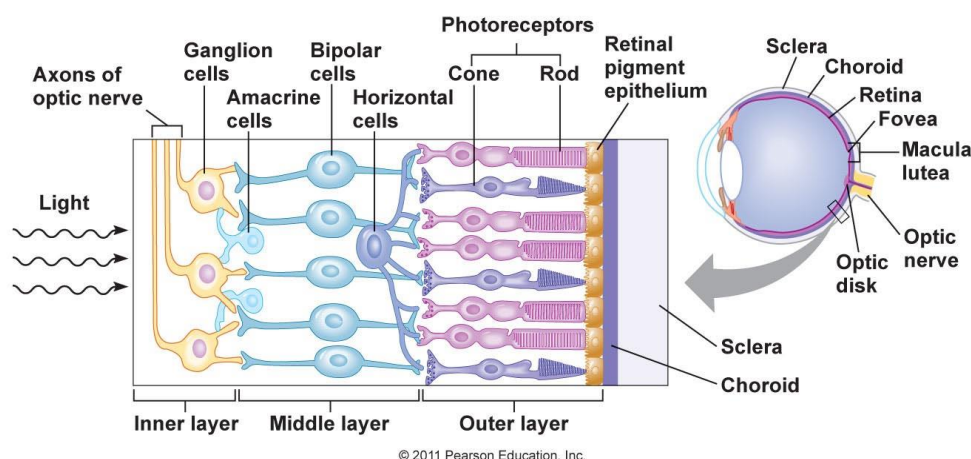


Figura 1 – Estrutura anatômica do olho humano e principais tipos de células da retina.

O principal mecanismo de transdução do estímulo luminoso envolve uma proteína transmembranar presente nos discos dos bastonetes (segmento *outer*) denominada rodopsina (um membro da família dos recetores acoplados a proteínas G). Ao ser exposta a luz de um determinado comprimento de onda, o seu cofator – *cis*-retinal (ligado covalentemente à cadeia polipeptídica) – isomeriza o *trans*-retinal na ligação entre os carbonos nº 11 e 12 (fig. 2A e B). Este acontecimento induz uma alteração

conformacional na proteína, que se converte em metarodopsina-II (Kong & Karplus, 2007; Ludwig & Cxyz, 2019; Solomons, Fryhle, & Snyder, 2017). Nesta forma instável, a componente proteica dissocia-se do *trans*-retinal e interage com uma outra proteína – a transducina. A ação da transducina resultará na ativação de um fosfodiesterase de cGMP. Quando não exposta à luz, o cGMP (GMP cíclico) no citoplasma dos bastonetes medeia a abertura de canais iónicos dependentes de cGMP que mantêm despolarizada a membrana destas células. Ao ser degradado, os canais iónicos (tipicamente de Na⁺ e Ca²⁺) fecham, o que leva a uma hiperpolarização dos bastonetes (fig. 2A). A diminuição destes iões (particularmente de cálcio) impede o recrutamento das vesículas de glutamato para a membrana, o que permite a despolarização das células bipolares e ganglionares, que por seu turno irão propagar o sinal até ao cérebro, pelo nervo ótico (Kong & Karplus, 2007; Ludwig & Cxyz, 2019). Nos cones, existe um análogo funcional da rodopsina – a iodopsina. O *cis*-retinal presente na iodopsina dos cones pode ainda absorver fotões a comprimentos de onda distintos, dependendo do ambiente químico em que está inserido na proteína (e que irá condicionar as diferenças de energia das suas orbitais moleculares) – este facto é particularmente importante para a visão cromática.

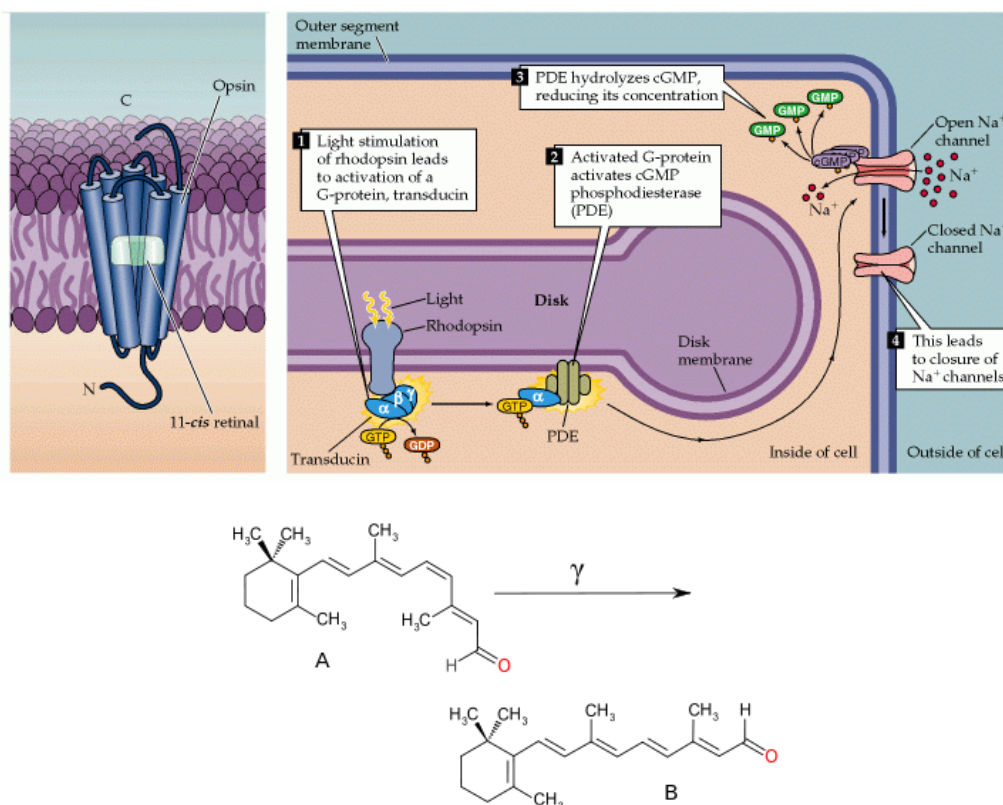


Figura 2 – (A, em cima) Mecanismo de transdução de sinal nos segmentos *outer* dos bastonetes, envolvendo modificações conformacionais na rodopsina através da isomerização do 11-*cis* retinal. (B, em baixo) Isomerização do 11-*cis* retinal por absorção de um fotão com comprimento de onda na zona do visível.

Aspetos pato-fisiológicos da retinite pigmentosa

Retinite pigmentosa (RP) é a designação atribuída a um conjunto de doenças genéticas hereditárias caracterizadas pela degeneração progressiva dos fotorreceptores do olho humano. Estima-se que, em todo o mundo, uma em cada 4000 pessoas sofra de retinite pigmentosa, fazendo desta uma desordem genética relativamente rara (Milam, Li, & Fariss, 1998). Apesar de universal na comunidade médica e científica, a aplicação do termo “retinite” para descrever esta patologia é semanticamente incorreta. “Retinite” é sinónimo de “inflamação retinal,” a qual não é, usualmente, sintomática desta doença. No que respeita à segunda parte do nome, o termo “pigmentosa” refere-se aos pequenos depósitos negros de melanina que se formam na retina durante as fases mais avançadas da doença (Milam et al., 1998). A nível sintomatológico, esta patologia é altamente variável, sendo que alguns pacientes sofrem perda de visão significativa durante a infância enquanto outros permanecem sem manifestações da doença até à idade adulta. A maioria dos afetados tende a seguir um padrão de desenvolvimento relativamente bem definido, iniciando-se os sintomas com dificuldades de adaptação ao escuro e por vezes até cegueira noturna durante a adolescência e primeiros anos da idade adulta. À medida que a doença se desenvolve, os pacientes tendem a perder visão periférica, acabando eventualmente por desenvolver uma visão tunelada. Perda de visão central (conduzindo à cegueira total) pode também ocorrer, sendo mais frequente em pacientes com mais de 60 anos de idade (Hartong, Berson, & Dryja, 2006). Ambos os tipos de fotorreceptores presentes no olho humano (cones e bastonetes) são afetados pela doença, embora a degeneração dos bastonetes tende a iniciar-se primeiro, sendo largamente responsável pela perda inicial de acuidade visual e a ser mais exacerbada na maior parte das variantes da doença do que a degeneração dos cones. Tipicamente, a perda de fotorreceptores de ambos os tipos inicia-se na região da periferia média da retina, sendo a posterior eventual perda dos receptores maculares a principal responsável pela perda de visão central (Hartong et al., 2006). O espectro da retinite pigmentosa inclui variantes sindrómicas (simultâneas a outra patologia) e não sindrómicas, sendo que se acredita que apenas 20-30% dos casos sejam sindrómicos. A síndrome de Usher, na qual a retinite pigmentosa aparece associada a deficiências auditivas, representa 20-40% de todos os casos de RP recessiva (10-20% dos casos totais), sendo assim a forma sindrómica mais frequente desta doença. Já a síndrome de Hardl-Biedl, na qual a retinite pigmentosa é variavelmente concomitante com obesidade, dificuldades cognitivas, polidactilia, hipogenitalismo e doenças renais, corresponde a cerca de 5-6% dos casos de RP (Hartong et al., 2006). Outro aspeto que varia consoante os diversos tipos de retinite pigmentosa é o modo de hereditariedade da doença, sendo

que cerca de 30-40% dos casos são herdados de forma autossômica dominante, 50-60% de forma autossômica recessiva e 5-15% por hereditariedade ligada ao cromossoma X (*X-linked*) (Hartong et al., 2006). Abordagens terapêuticas para este conjunto de patologia incluem o transplante de fotorreceptores e células retinais funcionais, a injeção intravítrea de fatores que prologam a sobrevivência dos fotorreceptores e, notoriamente, a terapia genética. Para esta última em particular, um bom conhecimento das bases genéticas e moleculares da patologia é indispensável (Milam et al., 1998)

Bases genéticas da doença e papel da RPGR

Estão identificados mais de 50 genes distintos cuja alteração pode resultar em retinite pigmentosa, sendo, portanto, uma doença bastante heterogênea (“Facts About Retinitis Pigmentosa | National Eye Institute,” n.d.). Como já foi referido, a RP pode ser herdada tanto por via autossômica dominante como recessiva, e ainda associada ao cromossoma X (recebendo o nome de *X linked retinitis pigmentosa*, ou XLRP, neste último caso). Uma das formas mais comuns (e com maior severidade) de RP envolve mutações no gene que codifica para a proteína reguladora de GTPase da retinite pigmentosa (RPGR), com transmissão associada ao cromossoma X (localiza-se na banda 11.4 do braço curto deste cromossoma). Pensa-se que mutações no gene da RPGR contribuam para 70-90% dos casos de XLRP e para 10-20% dos casos de RP em geral (Buraczynska et al., 1997; Lyraki, Megaw, & Hurd, 2016). O regulador de GTPase da retinite pigmentosa é uma grande proteína da qual existem, em humano, pelo menos 10 isoformas funcionais. Para além de possuir atividade de *guanine-nucleotide releasing factor*, está intimamente relacionada com o processo de ciliogénese (formação de cílios) – característica fundamental para a integridade estrutural dos bastonetes – e também de tráfego de proteínas entre os segmentos dos bastonetes. Dados recentes sugerem que a RPGR promove a formação de cílios ao desestabilizar os filamentos de actina nas regiões periciliares da membrana, permitindo uma maior *flexibilidade estrutural* da célula nestas regiões (Gakovic et al., 2011; Lyraki et al., 2016). Devido ao facto da presença dos cílios de conexão ser fundamental para a comunicação entre a extremidade *outer* (que contém os discos fotossensíveis ricos em rodopsina) e a extremidade *inner* dos bastonetes, a perda de função da proteína RPGR (mediante uma mutação, alteração de estrutura, truncagem...) tem por consequência a sua incapacidade de transportar, por exemplo, proteínas entre ambos os domínios celulares (entre as quais a própria rodopsina). Com efeito, outras hipóteses sobre as prováveis funções da RPGR sugerem que esta participa no *targeting* da rodopsina por ativação de proteínas RAB (figura 3) (Lyraki et al., 2016).

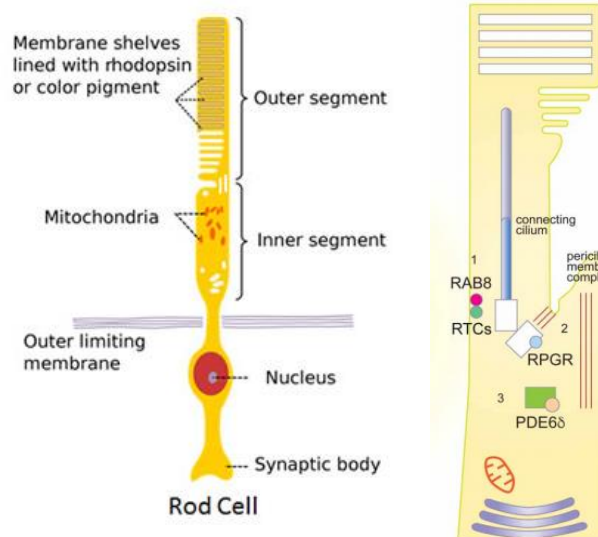


Figura 3 – Estrutura celular de um bastonete (esquerda). Potenciais efeitos da proteína RPGR na ciliogênese e tráfego proteico nos bastonetes (direita).

Na figura 4, estão representadas as estruturas das duas isoformas mais comuns do RPGR – a RPGR 1-19 (proteína resultante da tradução dos 19 exões do gene da RPGR) e a RPGR ORF-15, na qual foram excisados todos os exões 16-19 e retida uma porção intrônica a jusante do exão 15 (que inclui uma grande região repetitiva rica em glutamatos e glicinas) – tal ocorre por *skipping* de um local dador de *splicing* no exão 15. A RPGR ORF-15 é particularmente abundante na retina. As mutações que ocorrem ao longo desta forma da RPGR parecem estar mais intimamente implicadas nos fenótipos patofisiológicos de XLRP (Megaw, Soares, & Wright, 2015).

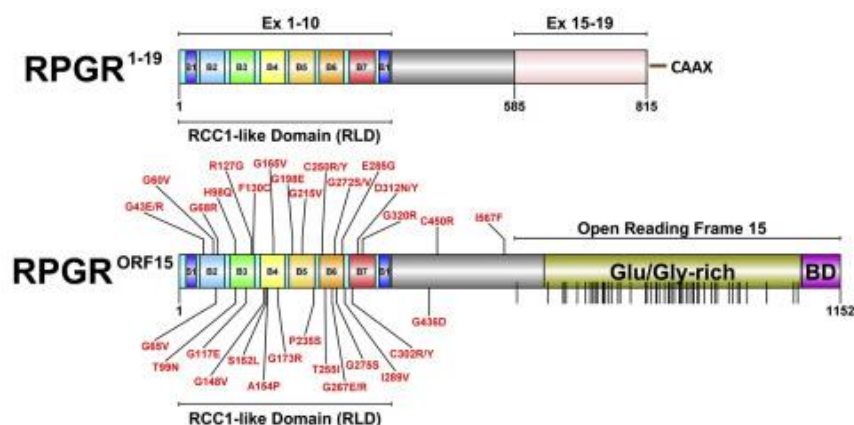


Figura 4 – Sequências das isoformas RPGR 1-19 e RPGR OFR 15, com representação dos domínios proteicos. Os domínios RCC1-like são responsáveis pela atividade de fator de troca de nucleótido da RPGR.

São, portanto, várias as mutações que conduzem a formas não funcionais da proteína RPGR. Apesar do foco deste trabalho incidir sobre as formas geradas por *splicing* alternativo, também mutações pontuais *missense* (troca de um único nucleótido), *nonsense* (codão *stop* prematuro) e deleção podem contribuir para proteínas RPGR mutadas, como esquematizado no quadro 1 (Buraczynska et al., 1997).

Quadro 2 – Exemplos de mutações no gene humano da RPGR que estão envolvidos na XLRP.

Mutation ^{a,b}	Patient(s)	Exon(s)/IVS ^b	Nucleotide Change ^a	Effect of Mutation
Nonsense:				
G52X	A520	Exon 2	G→T at 213	Gly→stop
W164X	A101	Exon 6	G→A at 551	Trp→stop
Q236X	A224	Exon 7	C→T at 765	Gln→stop
E374X	A863	Exon 10	G→T at 1179	Glu→stop
Missense:				
G60V	A507, A910	Exon 3	G→T at 238	Gly→Val
Deletion:				
430delC	A434	Exon 5	C at 430	Frameshift
928delA	A109, A463	Exon 8	A at 928	Frameshift
Deletion of exons 8–10	A380	Exons 8-10	Exons 8–10	Splice defect and frameshift
del1320/1338	A567	Exon 11	19 bp at 1320–1338	Frameshift
del1571/1572	A924	Exon 13	CA at 1571–1572	Frameshift
del1641/1644	A662	Exon 14	ACAA at 1641–1644	Frameshift
Splicing:				
IVS4+3	A779	IVS4 donor site	A→G at 369+3	Exon 4 skipping, in-frame deletion
IVS7+5	A387	IVS7 donor site	G→A at 837+5	Exon 7 skipping, in-frame deletion

^a Numbered according to Meindl et al. (1996).

^b IVS = intervening sequence (intron).

Para que se possa compreender de melhor forma o papel do *splicing* (e em particular do *splicing* alternativo) para a expressão gênica, iremos referir algumas das características deste processo. O *splicing* é um dos fenômenos que ocorre durante o processamento do mRNA transcrito em eucariotas, e corresponde à excisão regulada de sequências não codificantes (intrões) seguida da junção das regiões codificantes, as quais contêm a informação necessária para dirigir a síntese de uma proteína (exões). Todavia, um só transcrito de RNA pode dar origem a diferentes RNAs maduros (e consequente a diferentes proteínas) mediante as várias formas de como poderá sofrer *splicing* – a este fenómeno dá-se o nome de *splicing* alternativo. Tipicamente, o *splicing* alternativo não está necessariamente relacionado com nenhum processo anormal ou patológico, sendo um mecanismo de extrema importância para a síntese de alguns produtos génicos indispensáveis ao normal funcionamento celular – estima-se, inclusivamente, que cerca de metade dos genes humanos sofram *splicing* alternativo (Quintas, Freire, & Halpern, 2008). Todavia, determinadas mutações (cujas características serão detalhadas mais a diante), originam RNAs maduros não canónicos resultantes de *splicing* alternativo, que podem dirigir a síntese de proteínas sem função ou com ganho de função tóxica. Muitas das formas alteradas geradas por *splicing* alternativo correspondem a estruturas onde um ou mais exões foram excisados durante o processo, ou foram incorporadas regiões pertencentes a intrões no transcrito final (Liu & Zack, 2013; Mordes et al., 2006).

Durante o processo de remoção de um intrão, destacam-se três regiões principais, todas pertencentes ao segmento de RNA a ser excisado. Numa das extremidades do intrão existe o local doador, que consiste num dímero guanina-uracilo (inserido na sequência *consensus* A/C-A-G-**G-U**-Pu-A-G-U) e que irá sofrer uma reação de trans-esterificação

com um resíduo de adenina presente no interior do intrão (*branch site*), usualmente inserido na região *consensus* CUP_uAP_y, e que precede uma sequência de polipirimidina com 18-40 nucleótidos. Desta reação, resulta a formação de uma estrutura à qual se dá o nome de *lariat* e na libertação de um dos exões. O exão livre irá sofrer uma nova reação de trans-esterificação com um motivo adenina-guanina (inserido na sequência *consensus* Py_n-N-C-A-G-G) na parte terminal do intrão (local aceitador). Dá-se então a junção dos dois exões e a libertação do *lariat*. Todo o processo é facilitado pela ação do spliceossoma – complexo constituído por cinco pequenas ribonucleoproteínas nucleares, ou snRNPs, usualmente representadas por U1, U2, U4, U5 e U6 e ainda numerosas proteínas com funções reguladoras. Para além de serem o núcleo catalítico das reações que ocorrem durante o *splicing*, as snRNPs podem também auxiliar no direcionamento dos locais a serem processados, uma vez que a componente ribonucleica das snRNPs permite que estas se emparelhem eficazmente com as sequências *consensus*. No início do processo, U1 emparelha com o local dador e U2 com o *branch point*. De seguida, juntam-se as proteínas U4, U5 e U6 (esta última que substitui o papel da U1 no local doador). Pensa-se que o dinamismo das snRNPs dentro do spliceossoma (levado a cabo à custa da hidrólise de ATP) assegura a fiabilidade do processo (figura 5) (Quintas et al., 2008). Estas reações ocorrem somente entre grupos químicos do esqueleto ribose-fosfato do RNA em particular entre os grupos hidroxilo 3'-OH e os fosfatos), servindo as bases azotadas somente como marcadoras para o recrutamento do *spliceossoma* e outros fatores.

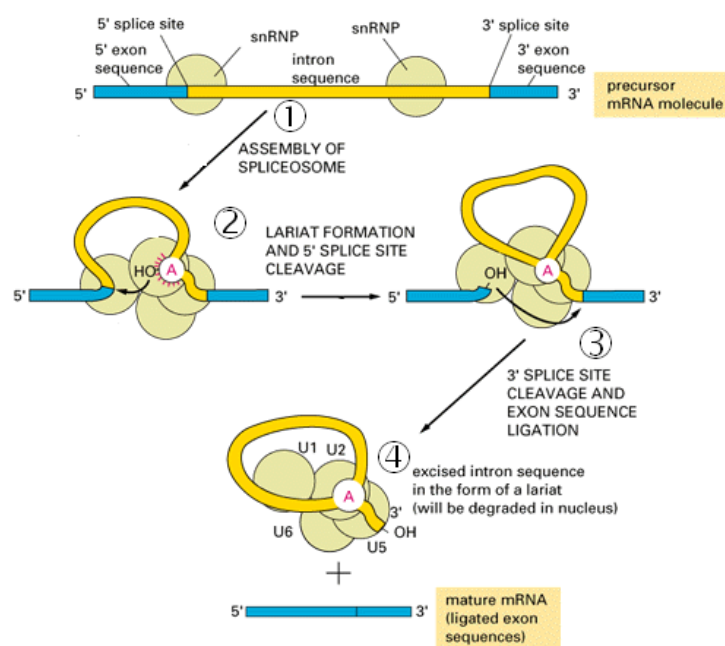


Figura 5 – Mecanismo de *splicing*, reações de transesterificação e entidades do spliceossoma envolvidas.

No que respeita ao *splicing alternativo*, existe ainda alguma incerteza sobre quais os mecanismos exatos que dirigem diferencialmente as formas de processar um transcrito primário – ou, por outras palavras, o “código do *splicing*”. Tem sido atribuído um papel de extrema importância às proteínas reguladoras que, juntamente com as snRNPs, participam em todo o processo, e modulam a eficiência de ação do spliceossoma numa dada região do RNA (figura 6). Sabe-se hoje que o produto de RNA processado fica perfeitamente determinado pela ação regulatória conjunta e sinérgica de todos os elementos atuadores em *cis* (que compreendem as sequências clássicas de *splicing* e ainda sequências intrónicas ou exónicas que funcionam como *enhancers* e repressoras do *splicing*) e os elementos atuadores em *trans* (que incluem, por exemplo, as proteínas ativadoras/silenciadoras que se ligam aos *enhancers* e sequências repressoras, respetivamente) (Wang et al., 2015). Um tipo de proteínas já bem caracterizado que atuam como ativadoras (ligando-se a sequências *enhancer*) são as fosfo-proteínas nucleares ricas em serinas/argininas, ou proteínas SR. Por seu turno, as ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs) estão maioritariamente implicadas no reconhecimento de regiões repressoras – acredita-se que o papel destas proteínas seja particularmente decisivo na escolha dos locais de *splicing*, uma vez que podem ser facilmente reguladas por outras entidades da célula.

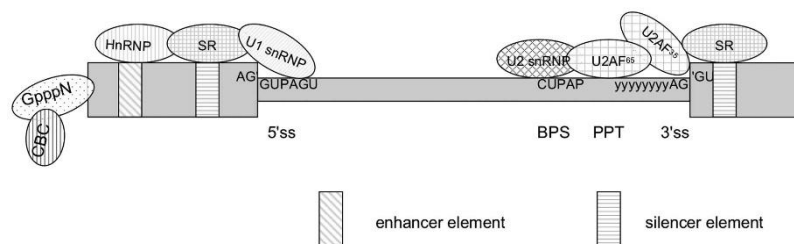


Figura 6 – Diferentes elementos em *cis* e fatores em *trans* responsáveis pela regulação do *splicing* alternativo.

Dado este cenário, é simples perceber que há dois tipos de mutações primordiais que comprometem o normal processamento: as que afetam os elementos em *cis* e os fatores regulatórios em *trans*. Com efeito, alterações de nucleótidos nas regiões *consensus* ou de ligação a proteínas reguladoras, podem impedir o *splicing* nessas zonas (conduzindo a modificações como a de *exon skipping* ou retenção de intrão). Por outro lado, algumas mutações podem formar novos locais de *splicing* no interior das sequências dos exões, levando a maquinaria celular a excisar erroneamente porções exónicas. Algumas destas formas de *mis-splicing* são apresentadas na figura 7 (Liu & Zack, 2013).

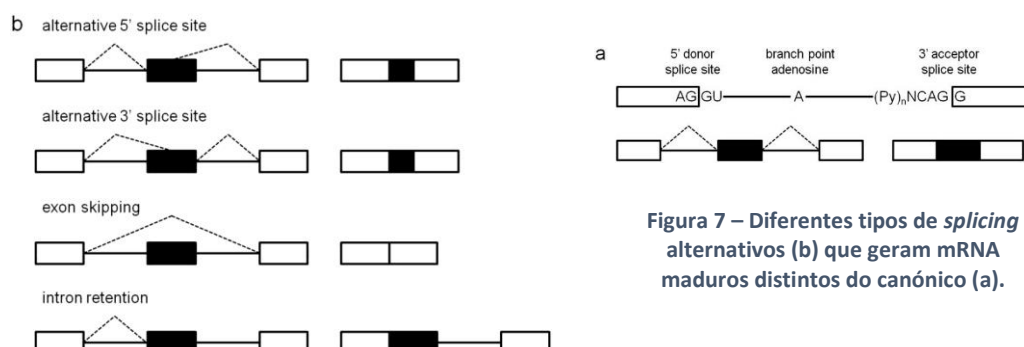


Figura 7 – Diferentes tipos de *splicing* alternativos (b) que geram mRNA maduros distintos do canónico (a).

No caso particular da XLPR, e do gene RPGR, foram e continuam a ser identificadas inúmeras mutações que geram formas não funcionais da RPGR com perfis idênticos aos anteriormente descritos (quadro 2) (Liu & Zack, 2013; Vervoort & Wright, 2002).

Quadro 2 – Mutações em *splice sites* no gene da RPGR (com implicações na XLRP).

Reference	Patient/family	Base change	Effect on splicing	Predicted effect on protein
Zito et al. [1999]	RP106	IVS1+1G→A	–	–
Sharon et al. [2000]	099-007		–	–
Zito et al. [2000a]	A		–	–
Zito et al. [1999]	RP1120	IVS1+5G→A	–	–
Miano et al. [1999]	XLPR-401	IVS2-2A→G	IVS2 retention	FS
Sharon et al. [2000]	004-202	IVS3-6T→A	–	–
Sharon et al. [2000]	004-169	IVS4+1G→A	–	–
Buraczynska et al. [1997]	A779	IVS4+3A→G	c.EX4del	No FS
Dry et al. [1999]	P9145	IVS5+G→T	Cryptic	FS, at residue 124
Zito et al. [2000b]	NZ1	IVS6+5G→A	–	–
Zito et al. [2000a]	B			
Buraczynska et al. [1997]; Bauer et al. [1998]	A387 XLPR142	IVS7+5G→A	c.EX7del	p.EX7del, no FS
Miano et al. [1999]	XLPR-DA	IVS8+1G→A	c.EX8del	p.EX8del, no FS
Guevara-Fujita et al. [2001]	A1021	IVS8+1G→C	c.EX8del	p.EX8del, no FS
Fujita et al. [1997]; Andréasson et al. [1997]	XLPR122	IVS10+3A→G	Normal and cryptic c.1285-1395del	p.del, no FS
Fujita et al. [1997]; Andréasson et al. [1997]	XLPR127	IVS13-8A→G	Cryptic, insert of 7 residues	FS
Miano et al. [1999]	XLPR-192	IVS13-2A→G	c.EX14del	p.EX14del, no FS
Sharon et al. [2000]	004-100	IVS13-1G→A	–	–

Vejamos a título de exemplo da mutação pontual A → G identificada por Fujita et al. (1997), que ocorre no 3º nucleótido do intrão nº 10 (IVS10+3) (quadro 2). A disrupção deste local doador favorece o *splicing* em locais intra-exônicos não canônicos que originam um mRNA truncado que não codifica 37 resíduos de aminoácidos – a grelha de leitura é, todavia, mantida (figura 8) (Liu & Zack, 2013; Vervoort & Wright, 2002).

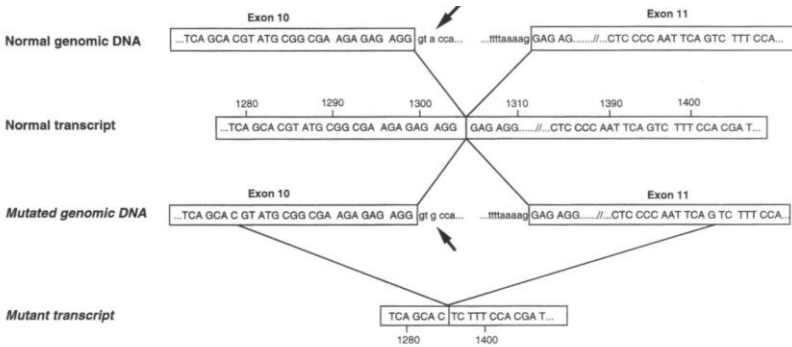


Figura 8 – Implicações da mutação no local doador do intrão 10 (IVS10+3) no gene da RPGR.

Modulação do *splicing* do gene RPGR

Dada a forte correlação entre deficiências no *splicing* do gene RPGR e certas variantes retinite pigmentosa (em particular XLRP), diversas abordagens terapêuticas procuram induzir a maquinaria spliceossomal a processar o mRNA de forma correta. Esta modulação do *splicing* pode ser feita de diversas formas, incluindo, por exemplo, a utilização de oligonucleótidos *antisense* (pequenos segmentos de RNA linear complementares com porções exônicas do pré-mRNA que permitem impedir a incorporação de porções exônicas no mRNA maduro – *exon skipping*), a inibição ou ativação de proteínas que interagem com a maquinaria de *splicing* (tais como os cinases que catalisam a fosforilação das proteínas SR), ou do fornecimento de pequenas moléculas de DNA que se ligam ao mRNA para exercer um efeito inibidor ou ativador do *splicing* (como é o caso dos ESEs, ESSs, ISEs e ISSs) (Bates, Morris, Oltean, & Donaldson, 2017). No entanto, no que toca particularmente ao gene RPGR, uma das estratégias terapêuticas mais promissoras envolve a utilização de um snRP U1 artificial para a correção de um defeito de *splicing*. Encontrando-se já bem documentado o papel da mutação c.1245+3A>T no *splice donor site* do intrão 10 do gene RPGR, a qual leva ao *skipping* do exão 10 e a uma proteína RPGR truncada, o fornecimento de uma snRNP U1 adaptada à mutação (capaz de reconhecer o local doador mutado) poderá aumentar os níveis de RPGR funcional, contribuindo assim para mitigar alguns sintomas da RP em indivíduos com esta mutação (figura 9) (Glaus, Schmid, Costa, Berger, & Neidhardt, 2009).

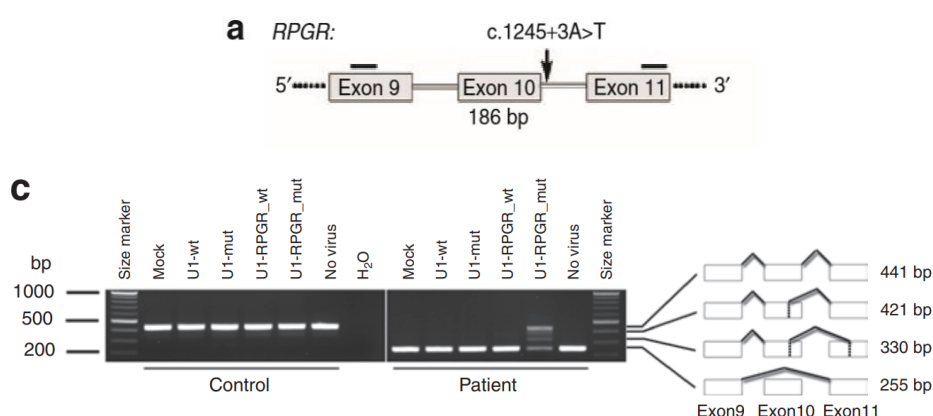


Figura 9 – Localização da mutação responsável pelo *mis-splicing* (a) e resultados do tratamento com um snRNP U1 modificado por RT-PCR – U1 modificada recupera uma fração do mRNA maduro funcional, contendo os exões 9, 10 e 11, ainda que outras formas *mis-spliced*, inclusive distintas do perfil gerado pela mutação c.1245+3A>T sejam também detetadas (5º poço a contar da direita do gel respeitante ao paciente com RP (c).

Bibliografia

- Bates, D. O., Morris, J. C., Oltean, S., & Donaldson, L. F. (2017). Pharmacology of Modulators of Alternative Splicing. *Pharmacological Reviews*, 1(69), 63–79.
- Buraczynska, M., Wu, W., Fujita, R., Buraczynska, K., Phelps, E., Andréasson, S., ... Swaroop, A. (1997). Spectrum of Mutations in the RPGR Gene That Are Identified in 20% of Families with X-Linked Retinitis Pigmentosa. *The American Journal of Human Genetics*, 61(6), 1287–1292. <https://doi.org/10.1086/301646>
- Facts About Retinitis Pigmentosa | National Eye Institute. (n.d.). Retrieved April 3, 2019, from https://nei.nih.gov/health/pigmentosa/pigmentosa_facts
- Gakovic, M., Shu, X., Kasioulis, I., Carpanini, S., Moraga, I., & Wright, A. F. (2011). The role of RPGR in cilia formation and actin stability. *Human Molecular Genetics*, 20(24), 4840–4850. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr423>
- Glaus, E., Schmid, F., Costa, R. Da, Berger, W., & Neidhardt, J. (2009). Gene Therapeutic Approach Using Mutation-adapted U1 snRNA to Correct a RPGR Splice Defect in Patient-derived Cells. *Molecular Therapy*, 19(5), 936–941. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.7>
- Hartong, D. T., Berson, E. L., & Dryja, T. P. (2006). Retinitis pigmentosa. *The Lancet*, 368, 1795–1809.
- Kong, Y., & Karplus, M. (2007). The Signaling Pathway of Rhodopsin. *Structure*, 15(5), 611–623. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2007.04.002>
- Liu, M. M., & Zack, D. J. (2013). Alternative splicing and retinal degeneration. *Clinical Genetics*, 84(2), 142–149. <https://doi.org/10.1111/cge.12181>
- Ludwig, P. E., & Czyz, C. N. (2019). *Physiology, Eye. StatPearls*. StatPearls Publishing. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29262001>
- Lyraki, R., Megaw, R., & Hurd, T. (2016). Disease mechanisms of X-linked retinitis pigmentosa due to RP2 and RPGR mutations. *Biochemical Society Transactions*, 44(5), 1235–1244. <https://doi.org/10.1042/bst20160148>
- Megaw, R. D., Soares, D. C., & Wright, A. F. (2015). RPGR: Its role in photoreceptor physiology, human disease, and future therapies. *Experimental Eye Research*, 138, 32–41. <https://doi.org/10.1016/J.EXER.2015.06.007>
- Milam, A. H., Li, Z., & Fariss, R. N. (1998). Histopathology of the Human Retina in Retinitis Pigmentosa. *Progress in Retinal and Eye Research*, 17(2), 175–205.
- Mordes, D., Luo, X., Kar, A., Kuo, D., Xu, L., Fushimi, K., ... Wu, J. Y. (2006). Pre-mRNA splicing and retinitis pigmentosa. *Molecular Vision*, 12, 1259–1271. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17110909>
- Quintas, A., Freire, A. P., & Halpern, M. J. (2008). *Bioquímica : organização molecular da vida*. Lidel. Retrieved from <https://www.wook.pt/livro/bioquimica-organizacao-molecular-da-vida-manuel-judice-halpern/200309>
- Solomons, T. W. G., Fryhle, C. B., & Snyder, S. A. (2017). *Organic chemistry*. Retrieved from <https://www.wook.pt/livro/organic-chemistry-t-w-graham-solomons/19193078>
- Vervoort, R., & Wright, A. F. (2002). Mutations of RPGR in X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Human Mutation*, 19(5), 486–500. <https://doi.org/10.1002/humu.10057>
- Wang, Y., Liu, J., Huang, B. O., Xu, Y.-M., Li, J., Huang, L.-F., ... Wang, X.-Z. (2015). Mechanism of alternative splicing and its regulation. *Biomedical Reports*, 3(2), 152–158. <https://doi.org/10.3892/br.2014.407>