

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FABIANE TAÍS DIESEL DEITOS

**BUSCA E ANÁLISE DE VARIANTES GENÉTICAS POTENCIALMENTE
PATOLÓGICAS EM UM CASO CLÍNICO DE NEURODEGENERAÇÃO COM
ATAXIA, DISTONIA E PARALISIA OCULAR**

CURITIBA

2017

FABIANE TAÍS DIESEL DEITOS

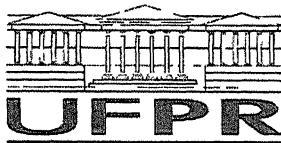
**BUSCA E ANÁLISE DE VARIANTES GENÉTICAS POTENCIALMENTE
PATOLÓGICAS EM UM CASO CLÍNICO DE NEURODEGENERAÇÃO COM
ATAXIA, DISTONIA E PARALISIA OCULAR**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Genética, no
Curso de Pós-Graduação em Genética, Setor
de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal do Paraná.

Orientadora: Dra. Cristiane Benincá
Co-orientador: Dr. Ricardo L. R. Souza

CURITIBA

2017



MINISTERIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação GENÉTICA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **FABIANE TAIS DIESEL DEITOS** intitulada **Busca e análise de variantes genéticas potencialmente patogênicas em um caso clínico de neurodegeneração com ataxia distonia e paralisia ocular** após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita a homologação pelo Colegiado ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós Graduação.

Curitiba, 29 de Setembro de 2017

RICARDO LEHTONEN RODRIGUES DE SOUZA

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

NINA AMÁLIA BRÂNCIA PAGNAN

Avaliador Externo (UFPR)

MEIRE SILVA BATISTELA

Avaliador Externo (UFPR)

RESUMO

As doenças neurodegenerativas de início na infância podem ser de difícil diagnóstico, já que é comum apresentarem heterogeneidade de sintomas, quadro clínico com evolução tardia e bioquímica inconsistente. Uma das ferramentas moleculares que auxilia no diagnóstico dessas doenças é o sequenciamento completo do exoma, capaz de investigar e identificar mutações pontuais, pequenas inserções e deleções em genes codificadores de proteínas que possam estar envolvidas nas patologias pesquisadas. Resultados negativos em exomas nem sempre se devem à ausência de alterações patológicas no DNA. Desta forma, a reanálise é fundamental em casos em que exista uma desconfiança para certa patologia de origem genética. O caso clínico apresentado neste estudo não possui um diagnóstico definido e o exoma foi realizado na tentativa de esclarecer a causa dos sintomas e buscar um tratamento adequado. Durante a reanálise do exoma algumas mutações pontuais foram encontradas e destas, duas alterações no gene *SQSTM1* (rs201239306 e rs370874635), responsável por codificar a proteína p62, foram selecionadas para uma investigação mais aprofundada, haja visto que ambas mutações apresentam baixa frequência populacional e poderiam alterar a função proteica. A proteína p62 atua em diversos processos celulares, entre eles a autofagia. Esta é responsável pela remoção de proteínas e organelas em processo de envelhecimento ou disfunção. Erros nesta via de degradação são fontes de uma grande variedade de doenças, incluindo as neurodegenerativas. A análise da variante rs201239306 (A426V), de herança paterna, demonstra uma grande possibilidade de causar deficiências na sua via de sinalização, uma vez que se encontra em domínio conservado em diversas espécies biológicas (UBA) e várias linhas de análise bioinformática suportam essa hipótese. A quantificação da proteína p62 revelou, em primeira análise, uma pequena diminuição da sua expressão na amostra da paciente, o que poderia indicar uma redução na sua tradução devido a alteração estar localizada na região 5'UTR. A quantificação de LC3 demonstrou, inicialmente, que a paciente possui um acúmulo desta proteína, indicando que a via autofágica está sendo afetada de alguma maneira. São necessários alguns testes complementares para concluir a base genética do caso clínico apresentado. Podemos sugerir, não obstante, segundo as análises apresentadas, uma disfunção na via de p62 como a causa da síndrome estudada.

Palavras-chave: autofagia, exoma, sequestosome1, neurodegeneração, p62

ABSTRACT

Early childhood neurodegenerative diseases may be difficult to diagnose, as they can present heterogeneity of symptoms, late evolution on clinical picture and inconsistent biochemistry. Exome sequencing is one of the available molecular tools to help in the diagnosis of these diseases as it is capable to identify point mutations, small insertions and deletions in genes encoding for proteins that may be involved in the pathologies under research. Negative results in exomes are not always due to the absence of pathological changes in DNA. Therefore, the reanalysis is fundamental in cases where there is a suspicion for a certain pathology of genetic origin. The clinical case presented in this study lacks a well-defined diagnosis and the exome was conducted to clarify the cause of the symptoms and search for an appropriate treatment. During this re-analysis, some specific mutations were found and two point mutations in the *SQSTM1* gene (rs201239306 e rs370874635), that encodes the p62 protein, were selected for further investigation since they both present low allelic frequency and also can alter the protein function. p62 protein acts on several cellular processes including autophagy. Autophagy is the cellular process responsible for the removal of dysfunctional proteins and organelles in normal homeostasis or during aging. Errors in this pathway of degradation are sources of a wide variety of diseases including neurodegenerative diseases. The analysis of the variant rs201239306 (A426V) presented with a paternal inheritance, showed possibilities of causing deficiencies in its signaling pathway, as it changes a well conserved aminoacid in several biological species (UBA domain). The bioinformatics analysis supported this hypothesis either. The quantification of p62 protein levels showed, a small decrease in the first analysis, and could indicate a decrease in its translation due to the alteration in the 5'UTR region. LC3 quantification initially demonstrated that the patient has an accumulation of this protein, indicating that the autophagic pathway is being affected in some way. Complementary tests are needed to conclude the genetic basis of this clinical case. We can suggest, however, according to the reported analysis, a dysfunction in the p62 pathway as the cause of the studied syndrome.

Key-words: autophagy, exome, sequestosome1, neurodegeneration, p62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	2
2 QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA	4
2.1 Caso Clínico	4
2.2 Doença neurodegenerativa e Ataxia	7
2.3 Gene SQSTM1 e proteína p62.....	8
3 OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo geral	14
3.2 Objetivos específicos	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Reavaliação do exoma.....	15
4.2 Coleta de sangue e extração de DNA para sequenciamento.....	16
4.3 PCR e Sequenciamento de DNA	16
4.4 Quantificação proteica de p62 por Western Blotting	18
5 ANÁLISE DE RESULTADOS	22
5.1 Exoma completo da paciente	22
5.2 PCR das regiões exônica e 5'UTR do gene SQSTM1	29
5.3 Sequenciamento de DNA das amostras	31
5.4 Quantificação da expressão de p62 por Westen Blotting.....	33
6 DISCUSSÃO	36
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

Um grande número de doenças neurodegenerativas que acometem a população estão associadas com a deposição intracitoplasmática de proteínas e organelas danificadas ou defeituosas. As proteínas ubiquitinadas que são agregadas irregularmente causam comprometimento sináptico, danos às organelas e morte celular no sistema nervoso central (KIRIYAMA; NOCHI, 2015).

A autofagia é um processo extremamente importante para a remoção de proteínas aberrantes e organelas que necessitam ser eliminadas. Quando este processo de reparo celular está comprometido pode ocorrer acúmulo de vacúolos autofágicas, que pode contribuir no desenvolvimento de diversas patologias neurodegenerativas, entre elas as doenças de Parkinson, doença de Alzheimer, Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) e outras que incluem sintomas como ataxia e distonia (CAO et al., 2006; KIRIYAMA; NOCHI, 2015).

Um dos genes envolvidos no processo de autofagia é o *SQSTM1* que codifica a proteína p62 que atua como sinalizadora, e está envolvida também na diferenciação e crescimento celular, tumorigênese e resposta ao estresse oxidativo (HAACK et al., 2016). As duas vias principais para a degradação de proteínas e organelas danificadas em células eucarióticas e manutenção da homeostase são as vias proteossômica por ubiquitinação e a via lisossomal (FUERTES; VILLARROYA; KNECHT, 2003). Nos seres humanos, variantes em heterozigose para *SQSTM1* que produzem mutações com perda de sentido e proteínas truncadas têm sido associadas com o distúrbio esquelético progressivo na Doença Óssea de Paget (PDB), os distúrbios neurodegenerativos em ELA (Esclerose Lateral Amiotrófica) e recentemente em miopatia distal com vacúolos bordados (HAACK et al., 2016).

Neste trabalho, analisamos um sequenciamento de exoma de resultado prévio negativo na busca de possíveis variantes causais para uma doença neurodegenerativa de início na infância com apresentação de ataxia e paralisia ocular. Resultados negativos em exomas realizados com finalidade de diagnóstico são bastante comuns, e muitas vezes não representam a ausência de uma alteração genética que esteja associada aos sintomas descritos. A reanálise de exomas se faz necessária de tempo em tempo, segundo a atualização das bases

de dados. Na presente revisão de exoma foram encontradas duas variantes em heterozigose para o gene *SQSTM1*, o que explicaria o fenótipo devido à deficiência no processo de autofagia, devido à perda de função da proteína p62.

O diagnóstico genético em doenças raras pode impactar positivamente no cuidado com o paciente, otimizando o atendimento, aconselhando a respeito do risco de recorrência da doença na família, aumentando assim as opções no pré-natal e identificando outros familiares que possam estar em risco além de contribuir na busca por um tratamento mais adequado, quando disponível (SAWYER et al., 2013).

2 QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA

2.1 Caso Clínico

Paciente L.J.S., do sexo feminino, nascimento em 21 de janeiro de 2013, internou no dia 16 de março de 2016 em hospital pediátrico de Curitiba para investigação de ataxia e alteração de movimentação ocular. Segundo relato dos pais, em agosto de 2015 iniciou quadro de ataxia de piora progressiva.

Pais não-consanguíneos, relataram gravidez sem intercorrências. A paciente nasceu a termo, com 38 semanas e 5 dias, sem intercorrências durante o parto. Os testes de triagem neonatal do pezinho, da orelhinha, olhinho e Ortolani apresentaram resultados normais ao nascimento. As vacinas estão em conformidade com o calendário nacional.

Mãe (A.J.) de origem alemã e italiana e pai (E.S.) de origem brasileira, possuem outra filha (J.J.S.) com 9 anos de idade, que apresenta epilepsia controlada por medicação.

L.J.S apresenta piora progressiva de distonia, nistagmo e hipertonia de membros superiores e inferiores. A mesma não anda, não fala e deglute com dificuldades.

Inicialmente a investigação por ressonância nuclear magnética (RMN) revelou atrofia cerebelar (FIGURA 1).

FIGURA 1 - IMAGENS DE TRÊS RESSONÂNCIAS MAGNÉTICAS DO CRÂNIO, INDICANDO PELA SETA A ACENTUADA ATROFIA CEREBELAR, EM IMAGENS ORDENADAS PELA ORDEM CRONOLÓGICA (A – NOVEMBRO DE 2015, B – ABRIL DE 2016 E C – JULHO DE 2016), NOTA-SE TAMBÉM IMPORTANTE ATROFIA DOS HEMISFÉRIOS CEREBRAIS.



FONTE: Exames de imagem da paciente (2015 – 2016)

Outros exames seguem a investigação clínica, tais como eletroneuromiografia, eletroencefalograma e cintilografia.

O exame de eletroneuromiografia realizado em novembro de 2015 revelou uma redução das velocidades de condução sensitiva obtidas nos nervos mediano, ulnar e sural, todos à esquerda. Concluiu-se com este exame a presença de polineuropatia sensitivo-motora desmielinizante.

Um eletroencefalograma (EEG) foi solicitado devido ao quadro de alterações na marcha, equilíbrio e pelos tremores das mãos em janeiro de 2016. O resultado do exame evidenciou atividade epileptiforme, tipo ponta, irregular e difusa, predominando a atividade nas regiões anteriores.

Devido aos episódios repetitivos de infecção do trato urinário foi realizada uma cintilografia renal dinâmica que revelou que o rim esquerdo possui dimensões aumentadas, porém com função glomerular preservada.

Os exames laboratoriais demonstraram um aumento do nível sérico de ácido fitânico. Os níveis séricos de ácido mensurados em duas amostras revelaram um aumento na primeira amostra testada, com resultado igual a 3,70 mcg/mL (valor de referência inferior a 2,00 mcg/mL) e em uma segunda avaliação o resultado foi de 1,07 nmol/mL (valor de referência inferior a 9,88 nmol/mL) demonstrando a queda no valor após dieta e plasmaférese, porém sem melhora dos sintomas clínicos.

As suspeitas de diagnóstico alavancadas pela equipe médica seriam de Doença de Refsum (OMIM 266500), Refsum Infantil (OMIM 601539) e Ataxia com Apraxia Oculomotora (AOA1 e AOA2, OMIM 208920 e 606002).

Em dezembro de 2015, foi realizado o sequenciamento do exoma completo da paciente, em laboratório especializado, a fim de investigar doenças raras, motivado pelo quadro clínico de ataxia, neuropatia periférica e atrofia cerebelar. O resultado obtido foi de ausência de alterações genéticas que justificassem o quadro clínico apresentado.

É importante destacar que um número substancial de mutações genéticas patológicas nas regiões reguladoras do genoma, bem como em exons que não são bem capturados, podem ser perdidos em uma análise de sequência de exomas (BRUIN; DAUBER, 2015).

Recentemente, devido ao quadro clínico de distrofia retiniana, L.J.S foi submetida, entre abril e maio de 2017, a avaliações do Potencial Evocado Visual que demonstrou que a paciente apresenta as vias ópticas funcionais em ambos os olhos. Por meio de uma retinografia de grande angular (Ultra-Widefield) verificou-se que ambos os olhos possuem papilas com bordas nítidas e coloração normal, vasos retinianos de aspectos normais, ausência de lesões periféricas detectáveis, concluindo com uma discreta alteração do reflexo macular bilateral. Exames de eletrofisiologia ocular apresentaram resultados de ondas anormais nas fases escóticas e fotópicas em ambos os olhos, sendo compatível com distrofia retiniana (retinose pigmentar). Com estes resultados, a análise indicou a possibilidade diagnóstica de lipofuscinose neuronal ceróide e ataxia espinocerebelar com retinose pigmentar (suspeita de Síndrome de Bassen-Kornzweig, OMIM 200100).

Os principais sintomas clínicos e alterações fisiológicas apresentadas pela paciente estão resumidos na TABELA 1, juntamente com os exames utilizados para confirmar as alterações clínicas observadas.

TABELA 1 - PRINCIPAIS SINTOMAS CLÍNICOS E ALTERAÇÕES OBSERVADAS NA PACIENTE E O MÉTODO DIAGNÓSTICO UTILIZADO PARA CONFIRMAR AS SUSPEITAS

Principais sintomas clínicos e alterações observadas	Método diagnóstico
Atrofia cerebelar e atrofia dos hemisférios cerebrais	Ressonância Nuclear Magnética
Polineuropatia sensitivo-motora desmielinizante	Eletroneuromiografia
Atividade epileptiforme	Eletroencefalograma
Rim esquerdo com dimensões aumentadas	Cintilografia renal
Perda de equilíbrio e coordenação motora, alterações oculares, rigidez e paralisia de membros superiores e inferiores	Análise clínica
Distrofia retiniana	Eletrofisiologia ocular

FONTE: O autor (2017)

2.2 Doença neurodegenerativa e Ataxia

O termo “doença neurodegenerativa” é utilizado para descrever uma gama de condições, que podem ser esporádicas ou hereditárias, caracterizadas por desordens progressivas do sistema nervoso resultantes da degeneração de neurônios no cérebro ou na medula espinhal (COPPEDÈ; MIGLIORE, 2015).

Os distúrbios degenerativos podem ser ocasionados pelo acúmulo de proteínas e organelas defeituosas, uma vez que as mesmas não são reduzidas por meio da divisão celular nos neurônios, desta forma, a autofagia é um processo essencial no controle de qualidade celular neuronal (KIRIYAMA; NOCHI, 2015).

Ataxia ou distaxia é caracterizada como um transtorno neurológico marcado pela redução ou perda de movimentos musculares voluntários e de equilíbrio. Está normalmente associada a uma degeneração ou bloqueio de áreas específicas do cérebro e cerebelo. A ataxia pode estar ligada a fatores genéticos hereditários ou podem ser adquiridas por efeitos ambientais, tumores entre outros (ABAHE, 2017).

As ataxias hereditárias com início na infância são um grupo de doenças heterogêneas, geralmente com herança autossômica recessiva. Em muitos casos, a ressonância nuclear magnética (RNM) revela sinais de atrofia cerebelar, que normalmente estão ligados a erros inatos do metabolismo. Defeitos mitocondriais, sendo principalmente os danos na cadeia respiratória, estão mais associados com as manifestações clínicas de atrofia cerebelar (BLASER et al., 2016).

Em várias das ataxias hereditárias, o gene causal desempenha um papel importante no reparo do DNA como nos casos da ataxia telangiectasia e ataxia com apraxia oculomotora tipo I e II (BLASER et al., 2016).

Muitas destas condições são caracterizadas por síndromes neurológicas complexas que incluem sintomas como neuropatia periférica sensorial-motora, espasticidade ou perda da cinestesia e sentido de vibração devido à degeneração da coluna dorsal, além da ataxia. A ataxia pode não ser a única anormalidade do movimento. Distúrbios do movimento hiperkinético, incluindo distonia, mioclonia e tremor, ocorrem em cerca de um terço dos pacientes com ataxia progressiva autossômica recessiva (PEARSON, 2016).

As doenças neurodegenerativas levam a quadros de incapacidade grave ou ainda morte precoce. Inúmeros casos de indivíduos afetados permanecem sem um diagnóstico molecular específico. A identificação de defeitos genéticos em condições comuns e raras podem fornecer conhecimentos fundamentais sobre a fisiopatologia e processos celulares básicos bem como a etiologia e tratamento dos sintomas clínicos (HAACK et al., 2016).

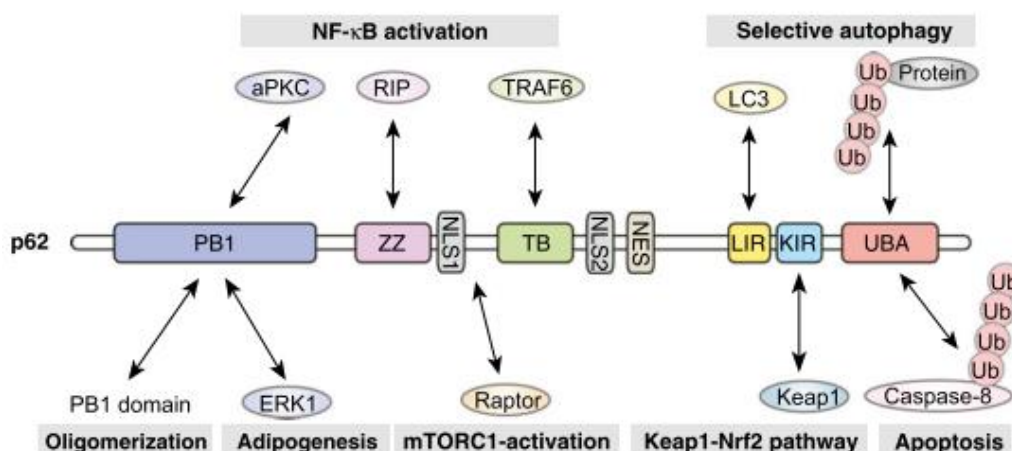
Atualmente, o diagnóstico de doenças raras pode ser auxiliado pelo sequenciamento completo do exoma, que analisa os exons ou regiões de codificação de proteínas, provenientes de milhares de genes, ao mesmo tempo. Esta técnica é capaz de analisar mais de 90% da região codificante do DNA. Comparando-se o exoma de um paciente com uma seqüência de referência normal, as variações na sequência do DNA de um indivíduo podem ser identificadas e relacionadas com os sintomas clínicos na busca da causa do transtorno médico (LEE et al., 2014; YANG et al., 2014; BRUIN; DAUBER, 2015).

2.3 Gene *SQSTM1* e proteína p62

O gene *SQSTM1* (*SEQUESTOSOME 1*, também conhecido como *P62*), localizado em 5q35.3, codifica uma proteína multidomínio, chamada p62, envolvida em vários processos celulares fundamentais, dentre eles a remoção de mitocôndrias danificadas por meio de autofagia seletiva (HAACK et al., 2016).

A proteína p62 é constituída por diversos domínios (FIGURA 2), incluindo Phox1 e Bem1p (PB1), domínio de zinco (ZZ), dois sinais de localização nuclear (NLS 1 e 2), um domínio de ligação ao fator de necrose tumoral associado ao fator 6 (TB), um sinal de exportação nuclear (NES), uma região de interação com a cadeia leve LC3 (LIR), uma região de interação com Keap1 (KIR) e um domínio associado à ubiquitina (UBA), podendo desta forma atuar por meio de diversas vias em diferentes processos celulares (KATSURAGI; ICHIMURA; KOMATSU, 2015).

FIGURA 2 - ESTRUTURA DE P62 DEMONSTRANDO OS MÚLTIPLOS DOMÍNIOS QUE CONSTITUEM A PROTEÍNA, AS MOLÉCULAS QUE INTERAGEM COM CADA DOMÍNIO E OS PROCESSOS EM QUE ESTÃO ENVOLVIDOS



FONTE: KATSURAGI; ICHIMURA; KOMATSU, 2015

Por exemplo, na via de sinalização de NF- κ B, p62 controla a osteoclastogênese, pela interação com a E3 ubiquitina ligase TRAF6, que também está envolvida na diferenciação de células T e na progressão tumoral. Além disso, p62 controla a adipogênese e conseqüentemente está ligada à obesidade, pela via de interação com ERK1, e a apoptose devido à ligação com caspase-8 (POROLLO et al., 2012).

A região C-terminal, onde se encontra o domínio de associação de ubiquitina (domínio UBA), compreendido entre os aminoácidos 389 a 434, torna a proteína p62/SQSTM1 capaz de se associar com proteínas e organelas marcadas com ubiquitina e interagir com LC3, levando aos processos de autofagia, mitofagia e apoptose (BITTO et al., 2014).

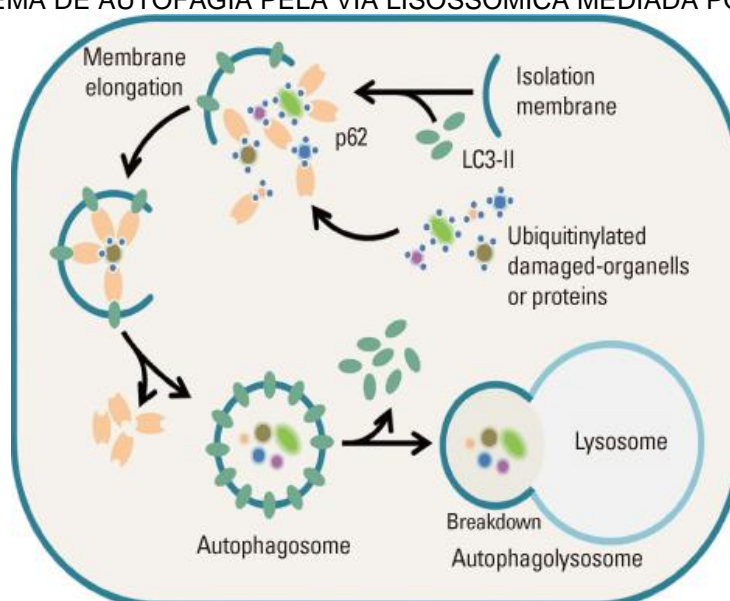
O principal papel da autofagia é o fornecimento de aminoácidos em resposta à falta de nutrientes na célula (KOMATSU; ICHIMURA, 2010). Este é um processo de auto-digestão que envolve a formação de vacúolos ligados à dupla membrana chamados autofagossomos que podem ser subsequentemente fundidos com o lisossomo para formar o autolisossomo. Neste processo, proteínas e organelas são entregues ao lisossomo para degradação e devolução de metabólitos à célula (LEE et al., 2014; YANG et al., 2017).

Durante o processo de formação do autofagossomo, a conjugação lipídica resulta na conversão da forma solúvel da cadeia leve 3 (LC3-I) na forma

associada a vesículas autofágicas LC3-II. Estes autofagossomos contêm vários domínios estruturais, tais como os domínios PB1, LIR (região de interação de LC3) e UBA. (LEE et al., 2014).

Após a formação do autolisossomo, as proteases são conduzidas por meio da fusão com endossomos tardios e atuam acidificando o meio. A membrana interna é degradada para formar o autolisossomo de uma única camada, onde os constituintes são finalmente degradados e reciclados novamente para a célula (FIGURA 3) (CAO et al., 2006).

FIGURA 3 - ESQUEMA DE AUTOFAGIA PELA VIA LISOSSÔMICA MEDIADA POR P62 E LC3



Nota: A autofagia é iniciada pela formação da membrana de isolamento. As proteínas ubiquitinadas podem ser direcionadas diretamente para a degradação através da via autofágica. A proteína p62 interage com proteínas danificadas ou organelas defeituosas ubiquitinadas na célula. O complexo é então vinculado seletivamente ao autofagossoma através da interação entre p62 e a cadeia leve 3 (lc3). Quando a membrana externa do autofagossoma se funde com um lisossoma, ele forma um autolisossoma. Finalmente, o material sequestrado é degradado dentro do autolisossomo e reciclado para a célula. FONTE: CHOI, T; KIM, S. 2013.

Adicionalmente, agregados de proteína p62 provocam a formação de autofagossomos diretamente. De forma independente, a p62 é capaz de se translocar à membrana do fagóforo e ao local de formação do autofagossomo, mesmo sem interagir com LC3 (SAHANI et al., 2014).

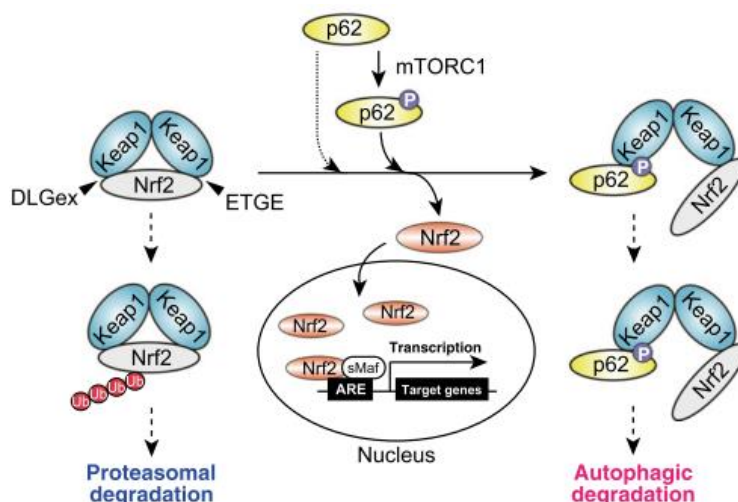
Além da via de autofagia, p62 também participa no sistema de ubiquitinação proteossômica (UPS), responsável pela degradação de proteínas solúveis de vida curta, sendo ativo tanto no citoplasma quanto no núcleo. A

marcação de proteínas-alvo com cadeias ubiquitinadas torna o sistema de ubiquitinação altamente seletivo (HEWITT; KOROLCHUK, 2017).

A Ubiquitinação é uma modificação pós-traducional que controla muitos aspectos da fisiologia celular. A Ubiquitina (Ub) é um polipeptídeo de 76 aminoácidos e de 8 kDa que pode ser encontrada em todas as células eucarióticas, conjugada covalentemente com uma vasta quantidade de proteínas. A ligação com ubiquitina gera proteínas-alvo para reconhecimento por um efetor das vias de degradação seletiva (MARBLESTONE et al., 2013).

A degradação proteossômica mediada pela p62 ocorre quando agregados de proteínas citotóxicas, mitocôndrias danificadas e micróbios invasivos são ubiquitinados, e p62 é fosforilada nos aminoácidos Serina407 e Serina403. Esta modificação aumenta a afinidade de ligação de p62 para cadeias de ubiquitina, fazendo com que ocorra a ligação de p62 nas cargas ubiquitinadas. Em seguida, a Serina349 de p62 é fosforilada pelo complexo de ativação da rapamicina 1 (mTORC1), e Keap1 é sequestrado nas cargas ubiquitinadas, resultando na ativação de Nrf2. Por fim, as cargas ubiquitinadas, juntamente com p62 fosforilada e Keap1, são degradadas pelo processo de autofagia (FIGURA 4) (KOMATSU; ICHIMURA; KATSURAGI, 2015).

FIGURA 4 - ESQUEMA DE AUTOFAGIA PELA VIA PROTEOSSÔMICA EM QUE A P62 ATUA COMO SINALIZADORA



Nota: A fosforilação de ser349 no domínio KIR, mediada por mTORC1, aumenta a afinidade de ligação de p62 para Keap1, inibindo competitivamente a interação entre Keap1 e Nrf2-DLGex. Como resultado, Nrf2 é estabilizado e depois se transloca para o núcleo para induzir a expressão de genes que codificam proteínas e enzimas anti-oxidativas, em cooperação com pequenas proteínas Maf (sMaf). P62 é um dos alvos de Nrf2, resultando em regulação por feedback positivo.

FONTE: KOMATSU; ICHIMURA; KATSURAGI, 2015

Além das vias de autofagia, a proteína p62 também tem sido relacionada com a resposta ao estresse oxidativo, atuando no sistema de reparo de danos ao DNA (KATSURAGI et al., 2015). Os danos ao DNA podem ser causados por incontáveis fatores extrínsecos como radiações ultra-violeta, radiação ionizante, e compostos químicos bem como por fatores intrínsecos como radicais livres, que são gerados de forma normal no metabolismo e por erros de replicação (HEWITT; KOROLCHUK, 2016).

A importância de p62 em diferentes processos celulares aponta para a possibilidade de que alterações em sua função possam contribuir para o desenvolvimento de diferentes doenças. Variantes heterozigóticas no gene *SQSTM1* foram associadas à Doença Óssea de Paget, na contribuição para a neurodegeneração na Esclerose Lateral Amiotrófica e na demência frontotemporal (HAACK et al., 2016).

Em um estudo realizado no Canadá, o gene *SQSTM1* foi investigado em pacientes que apresentavam o fenótipo clássico de adultos para a Doença Óssea de Paget (PDB). Em 16% dos casos esporádicos e em 46% dos casos de herança familiar foram encontradas mutações no gene, que estariam envolvidos com a etiologia da doença pela interação na via de NF- κ B (LAURIN et al., 2002). A mutação mais frequente foi encontrada no códon 392 do domínio UBA do gene *SQSTM1* resultando na troca do aminoácido prolina para leucina. Posteriormente, vários pesquisadores encontraram mutações no domínio UBA do gene *SQSTM1* em amostras de pacientes com PDB, demonstrando que as alterações no gene podem afetar as propriedades de poliubiquitinação e ligação do domínio UBA (EEKHOFF, et al., 2004; HOCKING et al., 2004; SETON et al., 2016).

Recentemente, em um estudo com 188 pacientes na França, foram encontradas quatro mutações heterozigotas com perda de sentido no gene *SQSTM1* em quatro casos de Demência Frontotemporal e Esclerose Lateral Amiotrófica. Embora a frequência encontrada seja baixa (2%) quando se avaliam os resultados semelhantes encontrados por outros pesquisadores há um forte indício do papel patogênico de p62 na Demência Frontotemporal (BER et al., 2013).

Em uma pesquisa com 546 pacientes com Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) familiar e esporádica, foram encontradas 10 mutações no gene *SQSTM1* (9

mutações heterozigotas com perda de sentido e uma deleção) em 15 pacientes (frequência de 2% a 3%). Estes achados fornecem mais uma evidência do papel genético direto da p62 na patogênese da ELA e sugerem que a regulação das vias de degeneração da proteína podem representar um importante alvo terapêutico na degeneração do neurônio motor (FECTO et al., 2017).

Por meio da técnica de sequenciamento do exoma, Haack et al. (2016) conseguiram identificar três variantes bialélicas resultando na perda de função de *SQSTM1* em nove indivíduos afetados de quatro famílias com transtorno neurodegenerativo com início na infância ou adolescência (*Neurodegeneration with Ataxia, Dystonia and Gaze Palsy - NADGP*). Os pacientes apresentavam anormalidades da marcha, ataxia, disartria, distonia, paralisia vertical do olhar e declínio cognitivo. Exames de Ressonância Magnética realizados nestes pacientes revelaram que 50% deles possuíam atrofia cerebelar. Os pesquisadores confirmaram a ausência da proteína p62 nos fibroblastos dos indivíduos afetados e encontraram evidências de defeito na resposta precoce à despolarização mitocondrial e à formação de autofagossomo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a etiologia genética do caso clínico apresentado, a partir da reanálise do exoma da paciente.

3.2 Objetivos específicos

- Buscar variantes possivelmente patológicas relacionadas com o histórico clínico do paciente
- Analisar o potencial patológico das variantes encontradas utilizando ferramentas bioinformáticas
- Sequenciar a região gênica das variantes rs201239306 e rs370874635 para comprovar a presença e segregação das mesmas no paciente e seus familiares diretos
- Quantificar a expressão proteica de SQSTM1/p62 para verificar a influência da variante rs370874635 em região reguladora.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reavaliação do exoma

A análise do exoma foi feita na empresa Mendelics por captura de exons com Nextera Exome Capture seguida por sequenciamento de nova geração com Illumina HiSeq. O alinhamento e identificação de variantes foi feito utilizando protocolos de bioinformática, tendo como referência a versão GRCh37 do genoma humano.

O resultado negativo do laudo do sequenciamento do exoma realizado para a paciente pode ser decorrente de: ausência de base genética para a condição investigada; presença de alteração em regiões não codificantes do genoma, tais como regiões reguladoras, sequências intergênicas e intrônicas distantes dos exons, que não são alvos da análise; ausência, no momento da realização do exame, de conhecimento completo a respeito da base genética da doença investigada; ou ainda, alterações genéticas decorrentes de expansão de repetições de nucleotídeos, mosaicismos, dissomia uniparental e de *imprinting* genômico. Devido a essas condições descritas no laudo apresentado, justifica-se a reanálise do exoma na busca de novas informações (laudo Mendelics).

A reanálise dos dados brutos do exoma foi feita em colaboração com o Dr. Rodrigo Coutinho (Departamento de Genética – UFPR) que realizou a anotação das variantes, sua frequência na população e genótipo encontrado.

Para a reavaliação do exoma realizado em dezembro de 2015 e com resultado inicialmente negativo, iniciamos uma compilação de todos os sintomas e exames da paciente, para o desenho de um painel de genes potenciais para o caso.

As variantes potenciais e seus respectivos genes, encontradas no exoma da paciente, foram investigados na base de dados ClinVar e a pesquisa das doenças neurodegenerativas relacionadas ao quadro clínico apresentado pela paciente foi feita na base de dados OMIM. As análises bioinformáticas para prever a patogenicidade das variantes foram realizadas nas bases de dados SIFT, PolyPhen, PROVEAN e SNPs&Go, utilizando as sequências fasta do gene e da proteína disponíveis na base UniProt.

4.2 Coleta de sangue e extração de DNA para sequenciamento

O projeto em questão foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Pequeno Príncipe. Foram coletadas amostras de sangue, em tubo contendo o anticoagulante EDTA, da paciente e seus familiares (pai, mãe e irmã) em consultas no hospital de acompanhamento do caso. As amostras foram processadas no laboratório de Polimorfismos, realizando a extração de DNA com kit para extração de DNA da marca Qiagen, seguindo as instruções do fabricante. A leitura das concentrações de DNA de cada amostra foi feita por espectrofotometria utilizando o equipamento Nanodrop 2000. As amostras de DNA ficaram estocadas em freezer com temperatura de -20°C.

4.3 PCR e Sequenciamento de DNA

Nas amostras foram analisados os polimorfismos *rs370874635* e *rs201239306* do gene *SQSTM1*, encontrados na reanálise do exoma da paciente. Os primers foram desenhados com auxílio de ferramentas online como Primer-Blast da NCBI e Primer3web e os primers selecionados estão descritos na TABELA 2.

TABELA 2 - INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS PRIMERS UTILIZADOS PARA ANÁLISE DAS VARIANTES

Variante	Região do gene	Primer Forward (5' - 3')	Primer Reverse (5' - 3')	Tamanho do produto em pares de bases (pb)
rs370874635	5'UTR	GGGCAATGAAGAGAGGGG TC	CGGTAGTGCCTGGAA G	450 pb
rs370874635	5'UTR	GGGCAATGAAGAGAGGGG TCA	CAGAAGCTGAAGCGGCG AATCT	324pb
rs201239306	Exon	CGGCTGATTGAGTCCCTCT C	TAGGCAAGCTATGTGCT GGG	463 pb

FONTE: BLAST e Primer3web (2016)

Foram desenhados dois pares de primers para a variante *rs370874635*, localizada em região 5'UTR, devido às tentativas de amplificação das amostras e

sequenciamento com o primeiro par de primers não terem sido satisfatórias. Em uma análise dos sequenciamentos obtidos com o primeiro par de primers concluímos que a região sequenciada não correspondia à região de interesse.

As PCRs foram realizadas com um volume total de 50 µl contendo 50 ng de DNA genômico, 0,5 µM dos primers Fw e Rv (GBT oligos, Ludwig, Alvorada-RS), 0,2 mM dNTP mix (ABM), 1,5 mM MgCl₂ (ABM) e 2,5 U de Taq DNA Polimerase (ABM).

O termociclador utilizado foi um Mastercycler (Eppendorf), com condições de desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, seguidas de 36 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 57°C por 1 minuto para o Exon; extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos.

Para a região 5'UTR foram desenhados dois pares de primers, realizando gradientes de temperatura que variaram de 53°C até 65°C.

Devido a problemas com o sequenciamento dessa região, as amostras foram enviadas e serão amplificadas e sequenciadas em colaboração com o Laboratório Mantis de diagnósticos moleculares em Curitiba.

Após comprovação dos fragmentos amplificados por gel de agarose para a região do exon, estes foram purificados por kit (Ludwig) conforme instruções do fabricante. As amostras tiveram as concentrações de DNA verificadas por espectrofotometria. Na sequência foi realizada a reação de sequenciamento, utilizando de 30 a 90 ng de DNA por amostra, 0,5 µL de primer (Fw ou Rv a 5picoMol), 1 µL de BigDye em um volume total de 10 µL. As amostras foram enviadas ao Departamento de Bioquímica da UFPR onde foram realizados os sequenciamentos das amostras de DNA por método de Sanger, utilizando o sequenciador automático de DNA, modelo *Genetic Analyzer 3500*, pela reação de "*Big Dye Terminator Cycle Kit*" conforme instruções do fabricante utilizando todos os primers descritos.

Os sequenciamentos foram analisados através do programa DNAbaser.

4.4 Quantificação proteica de p62 por Western Blotting

A técnica de Western Blotting (Towbin et al. 1979; Burnette 1981; Towbin and Gordon 1984) foi escolhida para a quantificação da proteína p62 por ser uma técnica amplamente utilizada e capaz de separar e detectar todos os tipos de proteínas extraídas de lisados celulares pela utilização de anticorpos específicos.

Para obter o lisado de proteínas da paciente e seus familiares, foram coletadas amostras de sangue total em tubo contendo o anticoagulante EDTA. Foram utilizadas amostras de sangue total devido a expressão de p62 ser satisfatória neste tipo de amostra (base de dados GTEX Analysis Release V6p).

Os experimentos descritos a seguir foram realizados no departamento de Patologia Básica da UFPR, com o auxílio do Dr. Susumu Higa.

De cada amostra de sangue, foram misturados 6 mL de sangue total com 48 mL de tampão de lise de eritrócitos (contendo cloreto de sódio e azida de sódio < 0,1%) em tubos de fundo cônico. Estas amostras foram homogeneizadas por inversão e incubadas entre 2 – 8 °C por 10 minutos e então centrifugadas por 2 minutos a 2.500 rpm. O sobrenadante foi descartado, o pellet de leucócitos foi ressuspenso e procedeu-se a lavagem com PBS frio seguido de centrifugação por 2 minutos a 2500 rpm por 3 vezes seguidas. A seguir foi acrescentado 1 mL de PBS para manter os leucócitos em suspensão. A suspensão foi transferida para um microtubo de 1,5 mL, os tubos foram centrifugados a 2500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado.

Foram acrescentados em cada microtubo contendo os leucócitos, 200 µL de tampão RIPA (*Radio Immunoprecipitation Assay buffer*) (contendo 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM Cloreto de sódio, 1,0% Triton X-100, 0,5% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS – *sodium dodecyl sulfate*) juntamente com um coquetel de inibidores de proteases (Roche) na diluição final de 1:10 para realizar a extração das proteínas totais.

Os microtubos foram incubados sob rotação em câmara fria a 4°C durante 1 hora. Após a incubação, os microtubos foram centrifugados por 10 minutos a 13.000 rpm em centrífuga refrigerada a 4°C. Em seguida, o sobrenadante de cada amostra foi transferido para um microtubo e o pellet foi descartado. As amostras

obtidas foram aliquotadas e diluídas 10 vezes para a realização da quantificação de proteínas totais pelo ensaio de Bradford.

Para o ensaio de Bradford foi utilizado como reagente padrão o BSA (*bovine serum albumin*) em diferentes concentrações para fazer a curva de padronização (de 1 µg a 6 µg), amostras controle de células HeLa, e tampão RIPA, além das amostras obtidas dos familiares e paciente. As amostras foram submetidas a leitura da absorbância em placa de Elisa, utilizando o comprimento de onda 595 nm. Os dados foram plotados no excel, obtendo-se a equação de ajuste linear, utilizada para converter o valor das absorbâncias das amostras em concentração de proteínas (TABELA 3).

TABELA 3 - AMOSTRAS UTILIZADAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS, MÉDIA DAS LEITURAS DE ABSORBÂNCIA E QUANTIDADE DE PROTEÍNAS TOTAIS OBTIDAS EM CADA AMOSTRA

Amostra	Média da leitura das concentrações dosagens (3)	Quantidade de proteínas por µL
RIPA	0,01	0,01 µg
Leucócitos paciente	0,21	1,05 µg
Leucócitos mãe	0,58	2,9 µg
Leucócitos pai	0,9	4,5 µg
Leucócitos irmã	0,7	3,5 µg

FONTE: O autor (2017)

As amostras foram conservadas adicionando-se tampão de amostras Laemmli (4% SDS, 20% 2 β-mercaptoetanol, 20% glicerol, 0,004% azul de bromofenol e 0,125 M Tris-HCl; pH 6,8) na diluição final de 1:5 e aquecidas por 5 minutos a 95°C.

Na sequência foram preparados dois géis de SDS-poliacrilamida (30% acrilamida, 1,5 M Tris pH 8,8, 10% SDS, 10% persulfato de amônio, TEMED) a 10%, concentração adequada para separar proteínas de 20 a 80 kDa, com espessura de 1,5 mm para a corrida das amostras. Os géis foram preparados e a solução foi adicionada ao aparato de corrida montado para polimerização.

As amostras foram aplicadas no gel, com um marcador de peso molecular baixo (LMW, BioRad), controle positivo de células HeLa, e 80 µg de proteínas por poço.

A corrida do gel foi realizada utilizando tampão de corrida contendo SDS, durante aproximadamente uma hora e trinta minutos, com 45 mA e por volta de 100V, correndo as amostras no sentido do cátodo para o ânodo.

Ao término da corrida do gel, foi realizada a transferência eletroforética das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose e foi confirmada a transferência das proteínas aplicando o corante Ponceau S sobre a membrana e visualizando a presença de bandas. O corante foi descartado, a membrana foi lavada com água destilada e na sequência com TBST 1X (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, água MilliQ) por três vezes com incubação por 10 minutos em gangorra. Na sequência a membrana foi bloqueada com leite desnatado a 5% incubando por 1 hora com agitação em gangorra.

Após o bloqueio, a membrana foi cortada entre as bandas de peso 55 pb e 40 pb, a parte superior da membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-p62 (SQSTM1 monoclonal antibody M01, clone 2C11, Catalog Number: H00008878-M01, Abnova, Taiwan) diluído 1:1000 em solução de bloqueio e a parte inferior foi incubada com anti-GAPDH (Abnova) diluído 1:1000. A incubação dos anticorpos primários foi feita por aproximadamente 16 horas sob agitação a 4°C. Na sequência os anticorpos foram recoletados e as membranas foram lavadas com TBST 1X por 3 vezes. Foi realizada então a incubação por uma hora a temperatura ambiente, com o anticorpo secundário anti-mouse-IgG (1:3000, Abnova) conjugado a peroxidase de rábano. Após esta etapa as membranas foram lavadas com TBST 1X por 3 vezes.

Para a revelação da membrana por quimioluminescência foi utilizado o revelador de claridade western ECL-pico com luminol e exposição por 30 segundos para anti-GAPDH e de uma hora para anti-p62, e então fez-se a revelação em filme fotográfico. Esta mesma técnica foi realizada para quantificar a proteína LC3 em todas as amostras; seguindo os mesmos passos até a incubação com anticorpos, que foi realizada com anti-GAPDH como controle interno e com o anticorpo anti-LC3 (Abnova, Taiwan), que ficou sob incubação por uma hora, e utilizando um total de 25 µg de cada amostra. A quantificação das

bandas foi realizada com o software ImageJ (v1.45j) e a normalização foi plotada em gráfico.

5 ANÁLISE DE RESULTADOS

5.1 Exoma completo da paciente

O exoma utilizado na reanálise foi realizado pela empresa Mendelics, que disponibilizou o arquivo dos dados (FASTQ).

A partir do alinhamento da sequência e anotação de variantes feitas em colaboração com o Dr. Rodrigo Coutinho do Departamento de Genética da UFPR, iniciamos a busca por genes candidatos, utilizando os seguintes critérios:

1. Variantes com frequência populacional menor que 1% (raras)
2. Variantes com efeitos deletérios (*frameshift*, *nonsense*, *missense*, *splicing regulation*)
3. Homozigose das variantes e/ou heterozigose composta para o mesmo gene
4. Relação domínio proteico, regulação de *splicing*, ou mesmo efeito sobre região promotora e fenótipo apresentado

Iniciamos a busca pela suspeita diagnóstica de Doença de Refsum que inclui os genes *PHYH/PEX7*. A doença de Refsum possui as seguintes variantes descritas na base de dados ClinVar: rs104894178, rs201578674, rs730882058, rs104894179, rs28938169, rs28939672, rs104894173, rs104894174. O gene *PEX1* também é descrito para a doença de Refsum Infantil, com as seguintes variantes descritas: rs61750420, rs121434455, rs61750415, rs863225084, rs370483961, rs756876301, rs863225085. Nenhuma destas variantes foi encontrada na paciente.

Para o gene *APTX* responsável pela Ataxia com Apraxia Oculomotora (AOA1 e AOA2) estão descritas as variantes: rs587776593, rs121908131, rs587776594, rs121908132, rs104894103, rs267606665, rs121434377, rs28940290, rs587776536, rs29001665, rs29001584, rs28941475, rs121434378, rs121434379, rs116333061, rs267607044, rs121434380, rs121434381 e rs587776537, também não encontrados no exoma da paciente.

As variantes encontradas no exoma para estes mesmos genes: *PHYH*, *PEX7*, *PEX1* e *APTX* e para os genes *MTP* e *APOB*, que foram investigados devido à recente suspeita diagnóstica da equipe médica (Síndrome de Bassen-

Kornzweig) estão reunidas na TABELA 4, juntamente com as frequências alélicas encontradas na população.

TABELA 4 - RELAÇÃO DE DOENÇAS SUGERIDAS PELA EQUIPE MÉDICA, RESPECTIVOS GENES, VARIANTES ENCONTRADAS NO EXOMA E FREQUÊNCIAS ALÉLICAS

Doença	Gene	Variantes encontradas	Frequência alélica^a
Doença de Refsum	<i>PHYH / PEX7</i>	rs11547656	0,32
		rs2273866	0,35
		rs751340	0,37
		rs7916926	0,41
		rs2452505	0,26
		rs512109	0,06
		rs825625	0,048
		rs1747682	0,97
		rs4872422	0,99
Refsum Infantil	<i>PEX1</i>	rs10742772	1
		rs11553094	0,01
		rs1143016	0,02
		rs11586985	0,08
		rs10594	0,45
		rs7169981	0,505
		rs622623	0,647
		rs2795067	0,670
		rs3802758	0,685
		rs1132349	0,69
		rs2494598	0,70
		rs38809	0,89
		rs10278857	0,95
		rs2480779	0,95
		rs972923	0,99
Ataxia com Apraxia Oculomotora (AOA1 e AOA2)	<i>APTX</i>	rs10971267	0,03
		rs17226291	0,04
		rs190368009	0,04
		rs79649832	0,04
		rs1197774	0,59
		rs200922655	0,97
Síndrome de Bassen- Kornzweig ou Abetalipoproteinemia	<i>MTP (MTPN/MTPAP)</i>	rs17168527	0,06
		rs12221163	0,31
		rs10826783	0,31
		rs2689215	0,94
		rs2484284	0,99
Hipobetalipoproteinemia Familiar 1	<i>APOB</i>	rs12691202	0,01
		rs1800479	0,12
		rs1042031	0,13
		rs1367117	0,17
		rs17240441	0,22
		rs1041968	0,25
		rs693	0,25
		rs679899	0,49
		rs1042034	0,63
		rs584542	0,986
rs568413	1		

Nota: ^aDados obtidos na base de dados Ensembl. A frequência alélica apresentada refere-se a base encontrada nas variantes da paciente. FONTE: Ensembl (2017)

Conforme demonstrado na tabela acima, as frequências alélicas para as variantes encontradas no exoma da paciente não sugerem que sejam variantes raras ou não apresentam dados de efeitos deletérios e possíveis de causar os sintomas descritos. A partir da avaliação dos polimorfismos descritos, descartamos momentaneamente as possibilidades diagnósticas sugeridas pela equipe médica, já que ainda poderiam existir mutações ou reorganizações dos genes em questão não detectadas pela técnica de sequenciamento de exoma.

Em relação ao gene *MTP*, envolvido com a Síndrome de Bassen-Kornzweig ou Abetalipoproteinemia (OMIM 200100), as variantes encontradas para este gene na paciente estão localizadas em região exônica com uma troca sinônima, ou em regiões intrônicas, com pouca possibilidade de causar efeitos deletérios.

Além da Abetalipoproteinemia, também investigamos a Hipobetalipoproteinemia Familiar 1 (OMIM 107730), devido a apresentação de quadro clínico semelhante. A Hipobetalipoproteinemia Familiar 1 é causada por uma mutação no gene *APOB*, cromossomo 2p24. Neste gene a paciente possui diversos polimorfismos, muitos deles causando mutações não sinônimas e de baixa frequência, como o polimorfismo rs12691202 com frequência alélica baixa, que produz uma mutação com troca de sentido, e a mudança de aminoácido, de Valina para Isoleucina na posição 730, descrita como uma mutação benigna ou tolerada (valores *in silico* SIFT).

Outra importante consideração nesse caso é a ausência de hipocolesterolemia, um dos principais sintomas em ambas as síndromes, o que não tem sido observado na paciente, que possui valores normais a elevados de colesterol nos exames realizados periodicamente.

Descartamos os genes já citados após a avaliação das variantes encontradas no exoma e suas frequências alélicas, juntamente com dados e exames clínicos.

A seguir, iniciamos a busca de genes candidatos a partir das variantes encontradas no sequenciamento de exoma que apresentavam frequência abaixo de 1% na população mundial, obtendo assim uma lista com 5116 variantes.

Realizamos uma busca na base de dados Clinical Genomic Database (NIH) na categoria de doenças neurológicas. Na sequência foram filtradas as condições neurológicas que envolviam ataxia e para as 5116 variantes encontradas, foram

localizados 97 genes. Descartamos as variantes sinônimas e intrônicas e encontramos variantes potenciais nos genes *KCNJ10*, *TTBK2*, *ATXN1*, *SCYL1* e *SQSTM1* (TABELA 5).

TABELA 5 - GENES CANDIDATOS, SIGNIFICÂNCIA CLÍNICA E DOENÇAS ENVOLVIDAS

Genes	Significância clínica^a	Doenças envolvidas^b
<i>KCNJ10</i>	Patogênico	Síndrome SeSAME – Síndrome com epilepsia, surdez sensorineuronal, ataxia e tubulopatia (OMIM 602208)
<i>TTBK2</i>	Benigno, significância incerta ou patogênico	Ataxia espinocerebelar 11 (OMIM 604432)
<i>ATXN1</i>	Benigno, significância incerta ou patogênico	Ataxia espinocerebelar 1 de herança autossômica dominante (OMIM 601556)
<i>SCYL1</i>	Patogênico	Mutações em heterozigose neste gene estão envolvidas com a Ataxia espinocerebelar autossômica recessiva (OMIM 607982)
<i>SQSTM1</i>	Benigno, significância incerta ou patogênico	Demência frontotemporal/Esclerose Lateral Amiotrófica, Miopatia distal com vacúolos bordejados, Neurodegeneração com ataxia, distonia, paralisia ocular de início na infância, Doença Óssea de Paget

FONTE: ^aClinVar (2017), ^bOMIM (2017)

Para o gene *KCNJ10*, atualmente relacionado a síndromes com sintomas que incluem epilepsia, ataxia, perda auditiva sensorineural e tubulopatia (Síndrome SeSAME), o exoma analisado apresentou uma variante não sinônima, rs1130183 com frequência alélica de 0,015 (Ensembl), porém as síndromes descritas para o gene são de origem autossômica recessiva o que não explicaria um efeito deletério da variante. Além disso, a paciente não apresenta sintomas renais e defeitos no balanço de eletrólitos até o momento.

O gene *TTBK2* apresenta duas variantes não-sinônimas no exoma da paciente, uma delas rs6493068 possui frequência alélica de 0,515 (Ensembl) e a outra, rs146279300 de 0,001 (Ensembl). Dados da base de dados OMIM indicam que a ataxia espinho-cerebelar 11 envolvida com o gene *ATXN1* pode ser de herança autossômica dominante, porém apresenta um quadro clínico relativamente benigno e de início tardio, o que não justificaria os sintomas apresentados pela paciente.

Para o gene *ATXN1*, a paciente apresenta a variante não-sinônima rs16885 com frequência alélica de 0,123 (Ensembl) e uma inserção de bases (CAG) em região exônica, porém sem alteração do quadro de leitura (*non frameshift insertion*).

No gene *SCYL1*, encontramos a variante rs56076708, que é marcada pela troca de uma base G por T, com frequência alélica de 0,003 (Ensembl). Este gene está relacionado a Ataxia espinocerebelar do tipo 11, de herança autossômica recessiva, o que novamente a descarta da investigação.

Entre os genes *KCNJ10*, *TTBK2*, *ATXN1*, *SCYL1* e *SQSTM1* o gene com maior correlação clínica de acordo com os sintomas clínicos apresentados pela paciente é o *SQSTM1*.

Para o gene *SQSTM1* localizado em 5q35.3, foram descritas na literatura diferentes síndromes como a Demência Frontotemporal e/ou Esclerose Lateral Amiotrófica (OMIM 105550) (PEARSON, 2016; BER et al., 2013), Doença Óssea de Paget Tipo 3 (OMIM 167250) (LAURIN et al., 2002; HOCKING et al., 2004), Miopatia distal com vacúolos bordejados (OMIM 617158) (BUCELLI et al., 2015) e mais recentemente a Neurodegeneração com Ataxia, Distonia e Paralisação Ocular com início na infância (NADGP, OMIM 617145) (HAACK et al., 2016). As doenças descritas para variantes no gene *SQSTM1* apresentam herança autossômica dominante, com exceção da NADGP que é de herança autossômica recessiva (HAACK et al., 2016).

O trabalho de Haack e colaboradores (2016), que apresenta muitas semelhanças com o caso clínico em estudo, foi publicado em setembro de 2016 o que poderia excluir este gene da análise de exoma feita pela Mendelics em 2015.

As variantes para o gene *SQSTM1* encontradas na paciente estão descritas na TABELA 6:

TABELA 6 - VARIANTES ENCONTRADAS NO GENE *SQSTM1* DA PACIENTE, SEUS TRANSCRITOS E FREQUÊNCIAS ALÉLICAS NA POPULAÇÃO

Variantes encontradas	Troca de base	Mutação nos transcritos gerados	Frequência alélica^a
rs201239306	C → T	troca de sentido	0,000199
rs2241349	G → A	região intrônica	0,401
rs4797	G → A	sinônima	0,587
rs4935	C → T	sinônima	0,694
rs370874635	G → A	5'UTR	0,002588

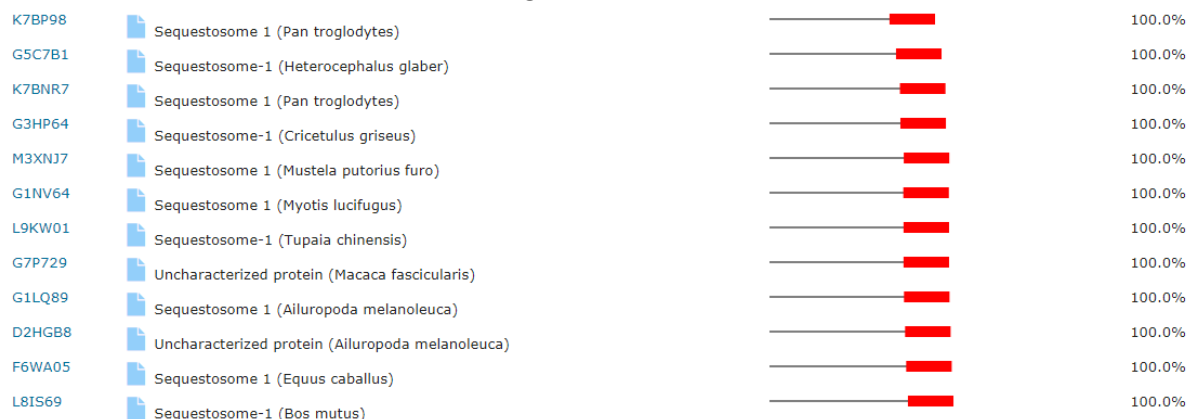
Nota: ^aDados obtidos na base de dados Ensembl, levando em conta a base presente na variante da paciente. FONTE: Ensembl (2017) / O autor (2017)

Nota-se que duas variantes (rs201239306 e rs370874635) possuem baixa frequência populacional tendo sido, portanto, selecionadas para a investigação. A primeira variante, localizada no exon 8 do gene, causa uma mutação de troca de sentido, com a mudança do aminoácido Alanina por uma Valina na posição 426 (A426V) com possível efeito deletério. Realizando análises *in-silico* foram encontrados os seguintes valores nas bases de dados: SIFT 0,00 (valor de corte deletério < 0,05); PolyPhen 1,00 (valor de corte > 0,5); PROVEAN -2,641 (valor de corte deletério < -2,5); SNPs&Go 0,490 (valor de corte deletério > 0,5).

É importante mencionar que a variante rs201239306, que modifica o aminoácido 426 de Alanina a Valina encontra-se inserida no domínio UBA, responsável pela interação com proteínas ubiquitinadas e início do processo de autofagia. A alteração do aminoácido vizinho G425R é descrito na literatura na Doença Óssea de Paget, sendo relacionada à perda de união a ubiquitina e aumento da ativação de NF- κ B (FALCHETTI et al., 2004; LONG et al., 2010; ZHAO et al., 2015).

Além disso, o domínio UBA da proteína p62 é altamente conservado em diversas espécies (FIGURA 5), o que demonstra a importância dessa região para o funcionamento correto da proteína.

FIGURA 5 - IMAGEM DO ALINHAMENTO DA REGIÃO UBA DA PROTEÍNA p62 EM DIFERENTES ESPÉCIES, MOSTRANDO A PORCENTAGEM DE IDENTIDADE COM A ESPÉCIE HUMANA



FONTE: Uniprot (2017)

Já o polimorfismo rs370874635 está localizado na região 5'UTR com possível efeito sobre a região reguladora do gene, apresentando frequência alélica populacional de 0,0002588 (Ensembl). A variante encontrada na região 5'UTR se aplica em 13 transcritos de mRNA (RNA mensageiro) produzidos pelo gene. Destes, uma parte resulta em proteínas codificadas, dois transcritos são retidos na região intrônica, dois transcritos são processados mas provêm de um RNA não codificante e dois transcritos são alvos de uma degradação de mRNA mediada por mutação sem sentido (NMD - *Nonsense-mediated decay*) (TABELA 7). Este sistema NMD de reparo de RNAs protege as células eucarióticas, detectando mutações sem sentido e evitando a expressão de proteínas errôneas ou truncadas (Ensembl).

TABELA 7 - LISTA DOS TRANSCRITOS QUE CARREGAM O POLIMORFISMO RS370874635, LOCAIS ONDE SE ENCONTRAM NO GENE, CONSEQUÊNCIA A PARTIR DO TRANSCRITO E POSIÇÃO DA VARIANTE NO TRANSCRITO

Identificação do transcrito	Localização da variante	Consequência	Posição da variante no transcrito
ENST00000389805.8	5'UTR	Proteína codificada	161 (de 2986 pb)

TABELA 7 - LISTA DOS TRANSCRITOS QUE CARREGAM O POLIMORFISMO RS370874635, LOCAIS ONDE SE ENCONTRAM NO GENE, CONSEQUÊNCIA A PARTIR DO TRANSCRITO E POSIÇÃO DA VARIANTE NO TRANSCRITO

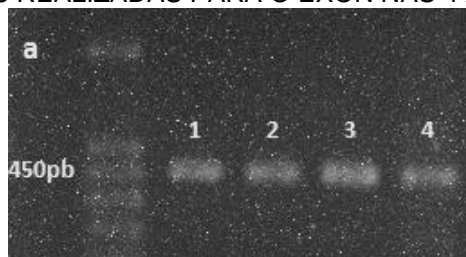
Identificação do transcrito	Localização da variante	Consequência	Posição da variante no transcrito
ENST00000453046.5	5'UTR e transcrito NMD	<i>Nonsense mediated decay</i>	15 (de 572 pb)
ENST00000504627.1	5'UTR	Proteína codificada	15 (de 602 pb)
ENST00000508284.5	5'UTR e transcrito NMD	<i>Nonsense mediated decay</i>	42 (de 578 pb)
ENST00000626660.1	5'UTR	Proteína codificada	35 (de 274 pb)
ENST00000422245.5	Intron	Proteína codificada	n/a ^a
ENST00000464493.5	Intron	Variante transcrita de RNA não codificante	n/a ^a
ENST00000481335.5	Intron	Variante transcrita de RNA não codificante	n/a ^a
ENST00000514093.5	Intron	Proteína codificada	n/a ^a
ENST00000360718.5	<i>Upstream</i> ao gene	Proteína codificada	n/a ^a
ENST00000466342.1	<i>Upstream</i> ao gene	Intron retido	n/a ^a
ENST00000485412.1	<i>Upstream</i> ao gene	Intron retido	n/a ^a
ENST00000510187.5	<i>Upstream</i> ao gene	Proteína codificada	n/a ^a

Nota: ^an/a = não se aplica, ou por não compor as proteínas codificadas ou por não haver dados nas bases consultadas. FONTE: Ensembl (2017).

5.2 PCR das regiões exônica e 5'UTR do gene *SQSTM1*

Para comprovar as variantes selecionadas e analisar sua segregação familiar, foram amplificadas suas regiões gênicas e sequenciadas. Amplificamos por PCR a região exônica contendo o rs201239306 para as 4 amostras (FIGURA 6). Os fragmentos de PCR da região exônica foram purificados por kit e foram submetidos à reação de sequenciamento.

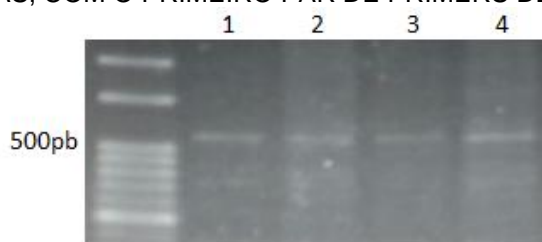
FIGURA 6 - IMAGEM DO GEL DE AGAROSE COMPROVANDO A PRESENÇA DE BANDAS PARA AS PCRS REALIZADAS PARA O EXON NAS 4 AMOSTRAS



Nota: Amplificação de PCR para região gênica da variante rs201239306 para as amostras: 1. Mãe, 2. Pai, 3. Irmã, 4. LJS. FONTE: O autor (2017)

Para o primeiro par de primers desenhado para a variante da região 5'UTR, foram realizadas várias tentativas, com gradientes que variaram de 53°C até 63°C. Nestes testes de gradiente obtivemos a amplificação das amostras com 57°C e a banda principal com aproximadamente 500 pb (FIGURA 7).

FIGURA 7 - IMAGEM OBTIDA DO GEL DE AGAROSE PARA A PCR DA REGIÃO 5'UTR PARA AS 4 AMOSTRAS, COM O PRIMEIRO PAR DE PRIMERS DESENHADO



Nota: Amplificação de PCR para região gênica da variante rs370874635 para as amostras: 1. Mãe, 2. Pai, 3. Irmã, 4. LJS FONTE: O autor (2017)

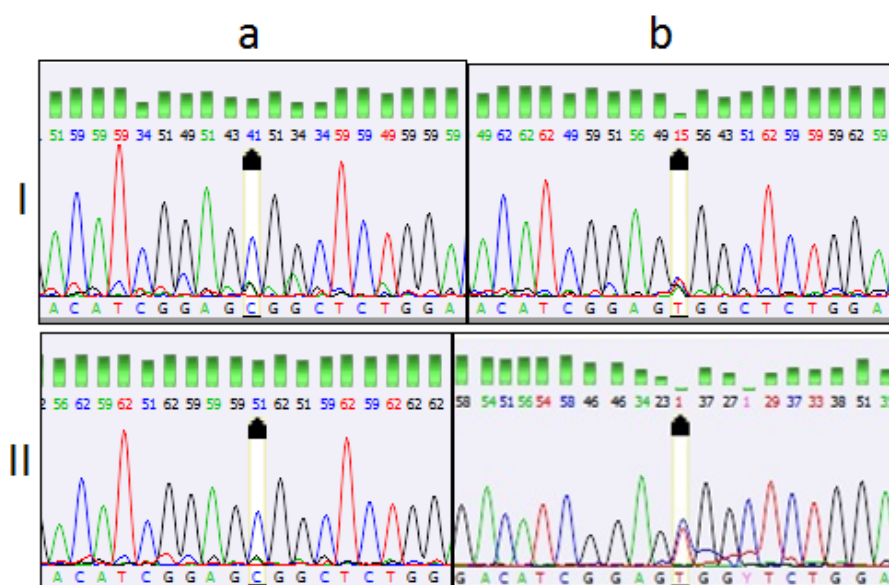
Foram realizados novos testes de PCR, onde obteve-se os mesmos padrões de bandas encontrados anteriormente. Cortamos as bandas do gel e prosseguimos com a reação de sequenciamento, porém o resultado obtido não correspondia ao gene *SQSTM1*, o que nos levou ao desenho de novos primers.

Para estes, foram realizados novamente gradientes de temperatura (variando de 55°C a 65°C), mas desta vez não obtivemos amplificação em nenhuma das temperaturas testadas, enquanto que as mesmas amostras com diferentes primers foram amplificadas.

5.3 Sequenciamento de DNA das amostras

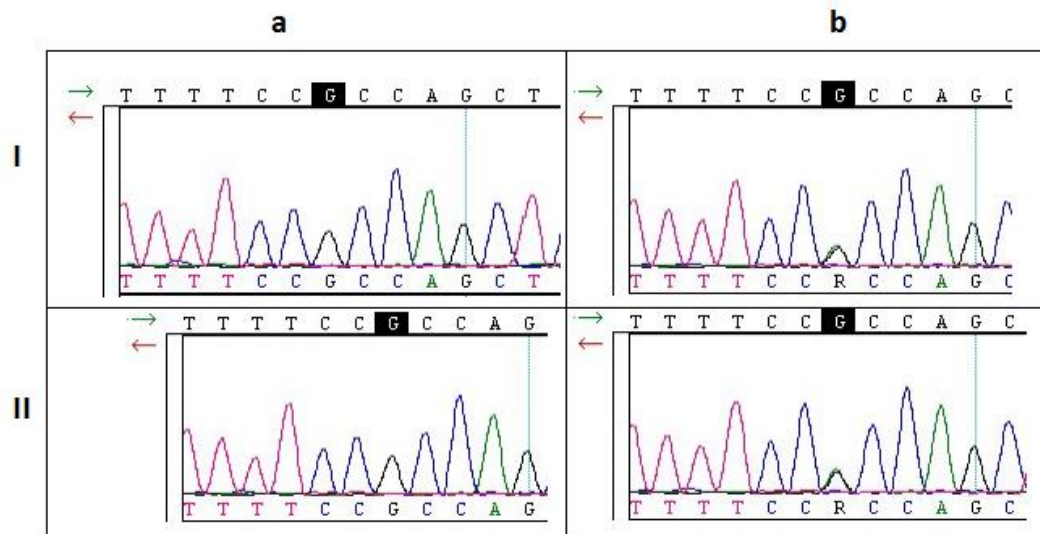
Com os resultados de sequenciamento obtidos, foram confirmadas a presença das mutações em heterozigose na região do exon (rs201239306) (FIGURA 8) e da variante rs370874635 em região 5'UTR (FIGURA 9) no DNA da paciente e no seu pai, demonstrando assim herança paterna de ambas as variantes.

FIGURA 8 - IMAGENS EXTRAÍDAS DOS ELETROFEROGRAMAS OBTIDOS NOS SEQUENCIAMENTOS DO EXON



Nota: Eletroferogramas das amostras de DNA da mãe (Ia), pai (Ib), irmã (IIa) e paciente (IIb), demonstrando nas setas a presença de uma base C para a mãe e irmã e a mutação (T) em heterozigose (C/T) para o pai e a paciente. FONTE: O autor (2017)

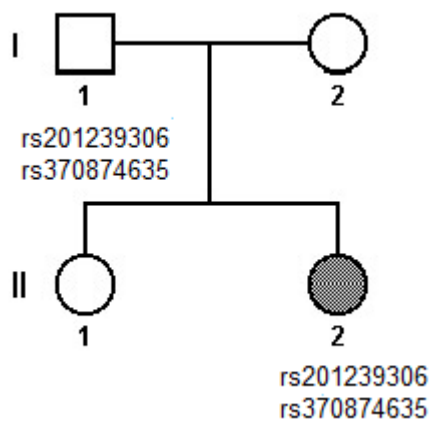
FIGURA 9 - IMAGENS EXTRAÍDAS DOS ELETROFEROGRAMAS OBTIDOS NOS SEQUENCIAMENTOS DA REGIÃO 5'UTR



Nota: Eletroferogramas das amostras de DNA da mãe (Ia), pai (Ib), irmã (IIa) e paciente (IIb), demonstrando nas bases demarcadas, a presença da variante rs370874635 no pai e na paciente.
 FONTE: Mantis (2017)

A partir dos dados encontrados é possível montar o heredograma (FIGURA 10) da família em estudo, onde o pai (I1) apresenta as duas variantes, que também aparecem em uma das filhas (II2), que expressa o fenótipo alterado.

FIGURA 10 - HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA EM ESTUDO MOSTRANDO O GENÓTIPO ENCONTRADO

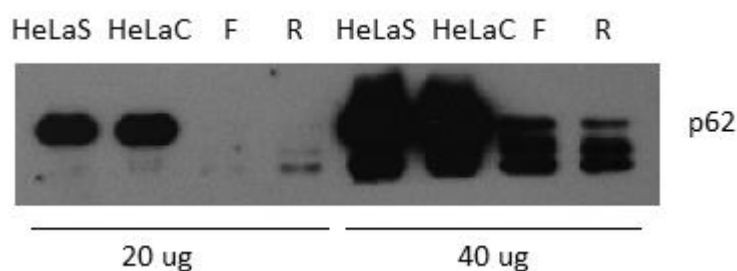


FONTE: O autor (2017)

5.4 Quantificação da expressão de p62 por Western Blotting

Devido a dificuldade para o sequenciamento da região contendo a variante rs370874635, decidimos quantificar a expressão da proteína p62 por Western Blotting, já que acreditamos que a variante poderia interferir na tradução da mesma por estar localizada na região 5'UTR. Para isso, foi realizada a padronização da técnica para o tipo de material desejado, dos anticorpos utilizados e tempo de exposição. No teste realizado utilizamos duas amostras de sangue de voluntárias (identificadas por F e R), células HeLa condicionadas sem nutrientes (HeLa starvation - HeLaS) em que se espera a redução da proteína p62 e com cloroquina 10 mM (HeLaC) em que se espera o aumento na expressão de p62, nas concentrações de 20 e 40 µg por poço. Utilizamos como controle positivo para o Western Blotting a β-actina, e a excitação dos anticorpos com ECL West-pico com exposição de dezoito horas (FIGURA 11). Devido a ausência de banda para as amostras F e R testadas, resolvemos aumentar a quantidade de proteína em cada poço do gel para 80 µg por poço e também trocar o marcador positivo de western de β-actina para GAPDH.

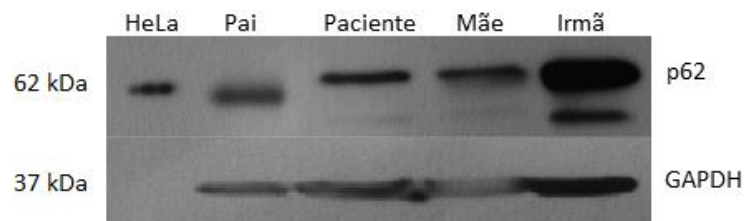
FIGURA 11 - IMAGEM DO WESTERN BLOTTING REALIZADO PARA PADRONIZACAO DA TÉCNICA



Nota: Western blotting mostrando a expressão de p62 (anticorpo anti-p62) em células HeLaS (HeLa starvation) e HeLaC (Cloroquina 10 mM), Leucócitos F e R. A Exposicao do filme foi de 18 horas. FONTE: O autor (2017)

Segundo a padronização da técnica, decidimos aumentar a quantidade de proteína carregada no gel, já que a exposição do filme foi bastante longa. Utilizamos portanto 80ug de proteína para as amostras da paciente e dos familiares onde foi verificada a presença de p62 em todas as amostras (FIGURA 12).

FIGURA 12 - PADRÕES DE BANDA OBTIDOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE p62 E GAPDH NAS AMOSTRAS DA PACIENTE, DOS FAMILIARES (80 µG) E CÉLULAS HELA (20 µG)

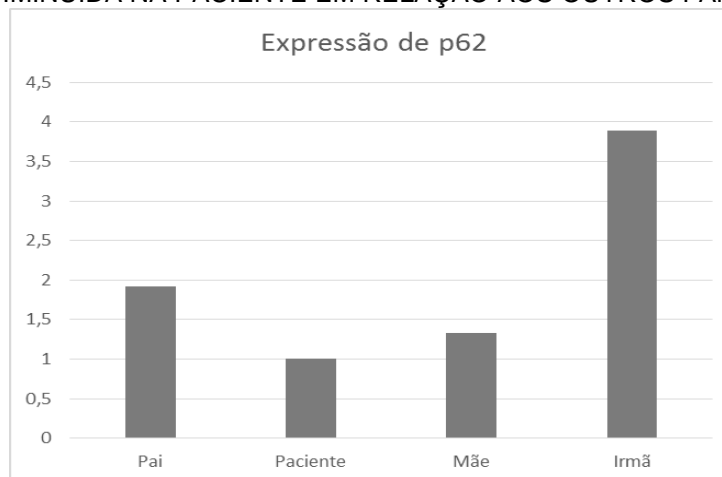


Nota: Western blotting mostrando a expressão de p62 (anticorpo anti-p62) em células Hela, amostras do pai, paciente, mãe e irmã. Tempo de exposição de 30 segundos para GAPDH e de 1 hora para p62. FONTE: O autor (2017)

Na imagem é possível verificar que a banda obtida para p62 na amostra do pai possui um peso molecular abaixo do esperado, de 62 kDa. Isto pode ser devido à degradação da amostra antes e durante o processamento, que poderia levar à degradação da proteína pesquisada e perda da estrutura.

Realizando a normalização das bandas (relação entre p62 e GAPDH) em cada amostra, obtivemos a quantidade de p62 expressa em cada indivíduo (GRÁFICO 1).

GRÁFICO 1 EXPRESSÃO DE P62 NAS AMOSTRAS DE CADA FAMILIAR. A EXPRESSÃO ESTÁ DIMINUÍDA NA PACIENTE EM RELAÇÃO AOS OUTROS FAMILIARES



FONTE: O autor (2017)

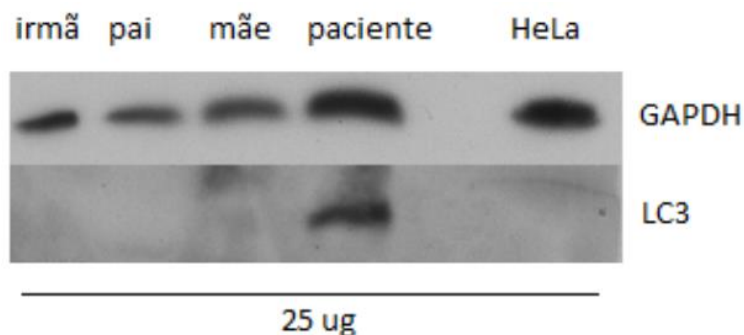
De acordo com os dados obtidos, é possível perceber uma pequena redução na expressão de p62 na paciente, quando comparada com os demais familiares. Da mesma forma, a irmã parece possuir uma quantidade maior de p62

expressa, porém a saturação da banda devido a uma maior quantidade de proteína (GAPDH) poderia levar a uma interpretação errônea nesta amostra.

Esta quantificação de p62 deve ser repetida para confirmar os dados encontrados, já que não foi possível realizar nova coleta a tempo.

Em uma quantificação inicial da proteína LC3 na amostra da paciente e seus familiares, encontramos uma quantidade aumentada de LC3 na amostra da paciente, quando comparada com seus familiares, o que pode sugerir uma alteração na via autofágica, que leva ao acúmulo de proteínas (FIGURA 13).

FIGURA 13 - PADRÕES DE BANDA OBTIDOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE LC3 E GAPDH NAS AMOSTRAS DA PACIENTE, DOS FAMILIARES E EM CÉLULAS HELA (25 µG)



Nota: Western blotting mostrando a expressão de LC3 em células Hela, amostras do pai, paciente, mãe e irmã. Tempo de exposição de 30 segundos para GAPDH e de 1 hora para LC3. FONTE: O autor (2017)

A quantificação de p62 e LC3 devem ser repetidas com novas amostras da paciente e familiares, para confirmar os dados encontrados até o momento.

Apesar disso, os dados obtidos com western blotting, sugerem que há de fato uma deficiência na via autofágica, devido à redução de p62 e ao acúmulo de LC3 na paciente.

Pode-se realizar a quantificação destas proteínas isoladas e também quando ligadas, para verificar se a interação entre elas está ocorrendo de forma normal na paciente. A quantificação de proteínas ubiquitinadas seria também uma forma de avaliar se o processo de autofagia está ocorrendo de maneira satisfatória.

Técnicas mais avançadas em proteômica, incluindo espectrometria de massa, podem ser utilizadas para determinar quantidade, estrutura e funcionalidade da proteína p62 na paciente e direcionar o diagnóstico clínico.

6 DISCUSSÃO

Após a reanálise do exoma completo da paciente, duas variantes no gene *SQSTM1* foram selecionadas e por meio de sequenciamento da amostra da paciente e seus familiares diretos, comprovamos a presença da variante rs201239306 no exon e da variante rs370874635 em região 5'UTR, ambas de herança paterna.

Podemos sugerir que a paciente possua ainda outro gene afetado nesta via de autofagia, o que estaria acarretando na redução da proteína p62 e acúmulo de LC3, levando aos sintomas e quadro clínico da paciente. Outras mutações podem estar afetando a outra fita de DNA, que não foi herdada do pai.

Considerando que o pai e a filha carregam as mesmas variantes com prováveis efeitos deletérios, de acordo com as análises bioinformáticas realizadas, esperamos que no caso do pai o alelo selvagem seja capaz de transcrever e produzir proteínas p62, sem gerar efeitos deletérios na via de sinalização.

A mutação encontrada no domínio UBA da paciente é responsável pela troca do aminoácido Alanina por uma Valina na posição 426 (A426V), ambos aminoácidos essenciais, com característica apolar e hidrofóbicos, podendo sugerir que a troca do aminoácido não afeta de maneira tão drástica a estrutura tridimensional, podendo ser responsável por uma redução, mas não a perda completa do funcionamento da proteína. Diferentemente do que ocorre em mutantes G425R em que a perda da ligação à cadeia de ubiquitina pode ser atribuída à uma substituição menos sutil de uma glicina, de polaridade neutra, para uma cadeia lateral de arginina, altamente polar, no mesmo sítio hidrofóbico de ligação à ubiquitina do domínio UBA (HOCKING et al., 2004).

Mutações no domínio UBA, que atua se ligando a outros domínios UBA ligados a cadeias de proteínas poliubiquitinadas, podem alterar o funcionamento proteico (LONG et al., 2010). Em um estudo envolvendo a relação entre o domínio UBA e as mutações encontradas na Doença óssea de Paget, Hocking et al. (2004) analisaram o efeito de diferentes mutações no domínio UBA na ligação a cadeias poliubiquitinadas. A mutação mais frequente, P392L que causa uma troca de sentido, modifica a estrutura secundária do domínio UBA, no entanto, a ligação

a cadeias ubiquitinadas não é afetada. A análise de outras mutações encontradas em casos clínicos, mostrou que as substituições M404V e G425R praticamente extinguem a capacidade do domínio UBA em se ligar a cadeias de ubiquitina, enquanto a substituição de G411S liga cadeias de ubiquitina de maneira similar com a encontrada na sequência selvagem.

Tudo indica que a variante rs201239306 seja patológica, porém para que seja confirmado seu efeito deletério estudos diretos dessa modificação *in situ* são necessárias, avaliando a via de sinalização diretamente.

A paciente pode ainda apresentar modificações no DNA que podem ocorrer em *cis* ou em *trans* no cromossomo onde o gene está inserido, o que pode afetar a expressão e função proteica de maneiras diferentes.

Os dados obtidos em western blotting deverão ser novamente comprovados, mas há indícios que a paciente apresenta defeitos na via autofágica.

Alguns pesquisadores acreditam que o comprometimento da autofagia geralmente é acompanhado por grande acúmulo de p62 seguido da formação de estruturas agregadas positivas para p62 e ubiquitina (MYEKU; FIGUEIREDO-PEREIRA, 2011; SAHANI et al., 2014; KATSURAGI et al., 2015). Mas outros estudos demonstram que tanto a redução quanto o acúmulo de p62 levam à um dano na degradação de substratos proteicos (BITTO et al., 2014).

Acredita-se, portanto, que o defeito na via de sinalização responsável pelo fenótipo analisado seja através da via de degradação de proteínas, o que levaria ao acúmulo de proteínas não degradadas.

Com relação aos sintomas clínicos apresentados pela paciente, existe uma grande relação com outro estudo em que os pacientes apresentam casos não resolvidos de síndromes neurodegenerativas manifestando anormalidades na marcha e ataxia. Nos afetados da primeira família, entre seis irmãos, três apresentaram problemas na marcha nos seus primeiros dez anos de vida chegando à dependência da cadeira de rodas entre os 16 e 32 anos de idade; outros sintomas incluem incontinência urinária, ataxia de membros superiores e declínio cognitivo. A última análise clínica, nas idades de 45, 42 e 33 anos mostrou distonia generalizada, disartria, síndrome cerebelar e paralisia ocular. Na segunda família, de nove filhos, três irmãos eram afetados apresentando instabilidade na marcha, problemas de coordenação e declínio cognitivo por volta

dos 10 anos de idade. Na última análise clínica aos 31, 18, e 12 anos, todos eram independentes para caminhar, mas apresentavam baixa estatura, síndrome cerebelar, paralisia ocular vertical, perda de audição e distonia. As ressonâncias magnéticas do cérebro mostraram atrofia cerebelar nos três irmãos afetados. Na terceira família, com um filho saudável e uma filha afetada, a filha apresentou, por volta dos sete anos de idade, tremores, apraxia oculomotora e disartria. Aos 18 anos de idade a mesma apresentava síndrome cerebelar e cognição prejudicada. Ressonância magnética do cérebro revelou atrofia cerebelar moderada. Todos os pacientes pesquisados neste estudo possuem mutações no gene *SQSTM1* (HAACK et al., 2016).

Nesta pesquisa, os dados encontrados indicam que as funções de *SQSTM1/p62* são de notável importância no cérebro, uma vez que a natureza pós-mitótica dos neurônios apresenta desafios especiais para a remoção de organelas danificadas e proteínas mal formadas (HAACK et al., 2016).

O fluxo autofágico anormal já foi implicado na patogênese de inúmeras desordens musculares, nas quais ela pode contribuir significativamente para a atrofia muscular. O comprometimento da autofagia causa vacuolização de fibras e acumulação intracelular de organelas anormais, proteínas ubiquitinadas e agregados de p62. Além disso, foram observados maior oxidação e estresse de retículo endoplasmático, que provavelmente são responsáveis pela degeneração muscular e disfunção muscular (CASTETS et al., 2016).

Embora hajam evidências da relação entre as mutações encontradas no gene *SQSTM1* e a história clínica da paciente, são necessários mais dados para chegar a uma conclusão diagnóstica, uma vez que existe uma grande heterogeneidade de síndromes e mutações envolvidas com o gene investigado.

Apesar de acreditarmos que as mutações sejam responsáveis pela síndrome apresentada pela paciente, os dados encontrados demonstram que não se trata da mesma doença descrita por Haack e colaboradores (2016), a Neurodegeneração com ataxia e paralisia ocular, que é de herança autossômica recessiva, o que não foi encontrado na análise genética da paciente.

Apesar disso, estas mutações podem estar atuando juntamente com outras variantes, localizadas em outros genes, para compor o quadro clínico observado na paciente.

As mutações presentes no DNA da paciente, que possuem herança paterna, podem ser deletérias para a paciente e não para o pai, pois este pode apresentar uma penetrância incompleta das mesmas variantes, o que explicaria a ausência de sintomas clínicos. Além disso a paciente e o pai podem ter graus de expressividade distintas para estas mutações (SEYMEN et al., 2014).

Devemos considerar ainda que o gene *SQSTM1* pode não ser o gene causal da síndrome, e sim um dos genes excluídos ou não cogitados no presente estudo. Para confirmar a origem genética do caso clínico, são necessárias as análises de outros genes e também a investigação de outras doenças.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existem indícios de que a paciente apresente defeitos no processo celular de autofagia, devido aos sintomas clínicos apresentados e a relação com os estudos já existentes que correlacionam a clínica com a expressão e funcionamento da proteína p62. A redução na expressão proteica pode sugerir que as mutações encontradas no gene *SQSTM1* estejam ligados ao quadro patológico da paciente.

Havendo a possibilidade de estudar os outros genes suspeitos, teremos mais informações que poderão auxiliar na confirmação do diagnóstico clínico.

REFERÊNCIAS

ABAHE (Brasil). Associação Brasileira de Ataxias Herediárias e Adquiridas. **O que é ataxia?** Disponível em: <http://www.abahe.org.br/sobre_ataxia/>. Acesso em: 20 mar. 2017.

BER, I. et al. SQSTM1 Mutations in French Patients With Frontotemporal Dementia or Frontotemporal Dementia With Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Jama Neurology**, France, v. 11, n. 70, p.1403-1410, 16 set. 2013. American Medical Association (AMA). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.3849>> Acesso em 11 abr. 2017.

BITTO, A. et al. P62/SQSTM1 at the interface of aging, autophagy, and disease. **Age**, [s.l.], v. 36, n. 3, p.1123-1137, 21 fev. 2014. Springer Nature. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1007/s11357-014-9626-3>> Acesso em 16 set 2017.

BJØRKØY, G. et al. P62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. **The Journal Of Cell Biology**. Rockefeller, p. 603-614. 21 nov. 2005.

BLASER, S. et al. The Pediatric Cerebellum in Inherited Neurodegenerative Disorders. **Neuroimaging Clinics Of North America**, v. 26, n. 3, p.373-416, ago. 2016. Elsevier BV. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nic.2016.03.007>> Acesso em 03 mar. 2017.

BLAST. Basic Local Alignment Search Tool. Disponível em <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>> Acesso em 20 nov 2016.

BRUIN, C.; DAUBER, A. Insights from exome sequencing for endocrine disorders. **Nature Reviews Endocrinology**, [s.l.], v. 11, n. 8, p.455-464, 12 mai 2015. Springer Nature. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2015.72>> Acesso em 10 set. 2017.

CAO, Y. et al. Autophagy Is Disrupted in a Knock-in Mouse Model of Juvenile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 281, n. 29, p.20483-20493, 19 mai 2006. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m602180200>> Acesso em 07 set. 2017.

CASTETS, Perrine et al. "Get the Balance Right": Pathological Significance of Autophagy Perturbation in Neuromuscular Disorders. **Journal Of Neuromuscular Diseases**, v. 3, n. 2, p.127-155, 27 mai 2016. IOS Press. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.3233/jnd-160153>> Acesso em 21 set. 2017.

CLINVAR. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>> Acesso em 01 dez 2016.

CHOI, T.; KIM, S. Autophagy in Redox Signalling. **Hanyang Medical Reviews**, v.

33, n. 2, p.83-89, 2013. Hanyang University College of Medicine (KAMJE). Disponível em <<http://dx.doi.org/10.7599/hmr.2013.33.2.83>> Acesso em 07 set. 2017.

COPPEDÈ, F.; MIGLIORE, L. DNA damage in neurodegenerative diseases. **Mutation Research/fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis**, v. 776, p.84-97, jun. 2015. Elsevier BV. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.11.010>> Acesso em 03 abr. 2017.

ECKHOFF, E. et al. Familial Paget's disease in The Netherlands: Occurrence, identification of new mutations in the sequestosome 1 gene, and their clinical associations. **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, n. 5, p.1650-1654, 2004. Wiley-Blackwell. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1002/art.20224>> Acesso em 02 mar. 2017.

ENSEMBL. Disponível em <<http://www.ensembl.org/index.html>> Acesso em 05 dez 2016.

EXAC Browser (Beta) | Exome Aggregation Consortium. Disponível em <<http://exac.broadinstitute.org/>> Acesso em 05 dez 2016.

FALCHETTI, A. et al. Two Novel Mutations at Exon 8 of the Sequestosome 1 (SQSTM1) Gene in an Italian Series of Patients Affected by Paget's Disease of Bone (PDB). **Journal Of Bone And Mineral Research**, [s.l.], v. 19, n. 6, p.1013-1017, 2 fev. 2004. Wiley-Blackwell. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1359/jbmr.040203>> Acesso em 01 mar. 2017.

PECTO, F. et al. SQSTM1 Mutations in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Archives Of Neurology*, [s.l.], v. 68, n. 11, p.1440-1446, 1 nov. 2011. **American Medical Association (AMA)**. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1001/archneurol.2011.250>> Acesso em 01 mar. 2017.

FUERTES, G.; VILLARROYA, A.; KNECHT, E. Role of proteasomes in the degradation of short-lived proteins in human fibroblasts under various growth conditions. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, [s.l.], v. 35, n. 5, p.651-664, maio 2003. Elsevier BV. Disponível em <[http://dx.doi.org/10.1016/s1357-2725\(02\)00382-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1357-2725(02)00382-5)> Acesso em 03 mar. 2017.

HAACK, T. et al. Absence of the Autophagy Adaptor SQSTM1/p62 Causes Childhood-Onset Neurodegeneration with Ataxia, Dystonia, and Gaze Palsy. **The American Journal Of Human Genetics**, [s.l.], v. 99, n. 3, p.735-743, set. 2016. Elsevier BV. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.06.026>> Acesso em 01 mar. 2017.

HEWITT, G. et al. SQSTM1/p62 mediates crosstalk between autophagy and the UPS in DNA repair. **Autophagy**, [s.l.], v. 12, n. 10, p.1917-1930, 8 jul. 2016. Informa UK Limited. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2016.1210368>> Acesso em 27 fev. 2017.

HEWITT, G.; KOROLCHUK, V. Repair, Reuse, Recycle: The Expanding Role of Autophagy in Genome Maintenance. **Trends In Cell Biology**, [s.l.], v. 27, n. 5, p.340-351, maio 2017. Elsevier BV. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2016.11.011>> Acesso em 02 mar. 2017.

HOCKING, L. et al. Novel UBA Domain Mutations of SQSTM1 in Paget's Disease of Bone: Genotype Phenotype Correlation, Functional Analysis, and Structural Consequences. **Journal Of Bone And Mineral Research**, [s.l.], v. 19, n. 7, p.1122-1127, 22 mar. 2004. Wiley-Blackwell. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1359/jbmr.0403015>> Acesso em 02 mar. 2017.

KATSURAGI, Y.; ICHIMURA, Y.; KOMATSU, M. P62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. **Febs Journal**, [s.l.], v. 282, n. 24, p.4672-4678, 16 out. 2015. Wiley-Blackwell. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1111/febs.13540>> Acesso em 27 fev. 2017.

KIRIYAMA, Y.; NOCHI, H. The Function of Autophagy in Neurodegenerative Diseases. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 16, n. 11, p.26797-26812, 9 nov. 2015. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.3390/ijms161125990>> Acesso em 01 mar. 2017.

KOMATSU, M.; ICHIMURA, Y. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. **Febs Letters**, [s.l.], v. 584, n. 7, p.1374-1378, 12 fev. 2010. Wiley-Blackwell. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2010.02.017>> Acesso em 03 mar. 2017.

LAURIN, N. et al. Recurrent Mutation of the Gene Encoding sequestosome 1 (SQSTM1/p62) in Paget Disease of Bone. **The American Journal of Human Genetics**. Usa, p. 1582-1588. 24 jan. 2002.

LEE, H. et al. Clinical Exome Sequencing for Genetic Identification of Rare Mendelian Disorders. **Jama**, [s.l.], v. 312, n. 18, p.1880-1887, 12 nov. 2014. American Medical Association (AMA). Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1001/jama.2014.14604>> Acesso em 27 fev. 2017.

LONG, J. et al. Dimerisation of the UBA Domain of p62 Inhibits Ubiquitin Binding and Regulates NF- κ B Signalling. **Journal of Molecular Biology**, v. 396, n. 1, p. 178–194, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2009.11.032>> Acesso em 02 mar. 2017.

MARBLESTONE, J. et al. Analysis of ubiquitin E3 ligase activity using selective polyubiquitin binding proteins. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Cell Research**, [s.l.], v. 1823, n. 11, p.2094-2097, nov. 2012. Elsevier BV. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.06.013>> Acesso em 20 set. 2017.

MYEKU, N.; FIGUEIREDO-PEREIRA, M. Dynamics of the Degradation of Ubiquitinated Proteins by Proteasomes and Autophagy. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 286, n. 25, p.22426-22440, 2 maio 2011. American Society for

Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m110.149252>> Acesso em 16 set. 2017.

OMIM. **OMIM® and Online Mendelian Inheritance in Man**. Marca registrada de Johns Hopkins University. Disponível em: <www.omim.org/entry>. Acesso em: 08 dez. 2016.

PEARSON, T. S. Reviews More Than Ataxia : Hyperkinetic Movement Disorders in Childhood Autosomal Recessive Ataxia Syndromes. **Tremor and Other Hyperkinetic Movements**, 2016.

POROLLO, A. et al. p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. **Journal of Molecular Cell**, v. 44, n. 1, p. 134–146, 2012.

POLYPHEN. PolyPhen-2 prediction of functional effects of human nsSNPs. Disponível em <<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>> Acesso em 02 mar 2017.

PRIMER3WEB. Primer3web version 4.0.0 - Pick primers from a DNA sequence. Disponível em <<http://primer3.ut.ee/>> Acesso em 20 nov 2016.

PROVEAN. Provean Protein. Disponível em <http://provean.jcvi.org/seq_submit.php> Acesso em 02 fev 2017.

SAHANI, M.; ITAKURA, E.; MIZUSHIMA, N. Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. **Autophagy**, [s.l.], v. 10, n. 3, p.431-441, 3 jan. 2014. Informa UK Limited. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.4161/auto.27344>> Acesso em 07 set 2017.

SAWYER, S. et al. Exome Sequencing as a Diagnostic Tool for Pediatric-Onset Ataxia. **Human Mutation**, [s.l.], v. 35, n. 1, p.45-49, 13 nov. 2013. Wiley-Blackwell. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1002/humu.22451>> Acesso em 05 abr 2017.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S, ELICEIRI, K. W. (2012), NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nature methods* **9(7)**: 671-675, PMID 22930834

SETON, M.; HANSEN, M.; SOLOMON, D. The Implications of the Sequestosome 1 Mutation P392L in Patients with Paget's Disease in a United States Cohort. **Calcified Tissue International**, [s.l.], v. 98, n. 5, p.489-496, 28 dez. 2015. Springer Nature. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1007/s00223-015-0103-5>> Acesso em 27 de fev. 2017.

SEYMEN, F. et al. ENAM Mutations with Incomplete Penetrance. **Journal Of Dental Research**, [s.l.], v. 93, n. 10, p.988-992, 20 ago. 2014. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0022034514548222>. Acesso em 13 out. 2017.

SIFT. Disponível em <<http://sift.jcvi.org/>> Acesso em 05 fev 2017.

SNPS&GO. Predicting disease associated variations using GO terms. Disponível

em < <http://snps.biocloud.org/snps-and-go/snps-and-go.html>> Acesso em 03 mar 2017.

UNIPROT. Disponível em < <http://www.uniprot.org/>> Acesso em 10 fev 2017.

YANG, S. et al. NF- κ B Signaling Activation Induced by Chloroquine Requires Autophagosome, p62 Protein, and c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Signaling and Promotes Tumor Cell Resistance. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 292, n. 8, p.3379-3388, 12 jan. 2017. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m116.756536>> Acesso em 27 fev. 2017.

YANG, Y. et al. Molecular Findings Among Patients Referred for Clinical Whole-Exome Sequencing. **Jama**, [s.l.], v. 312, n. 18, p.1870-1879, 12 nov. 2014. American Medical Association (AMA). Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1001/jama.2014.14601>> Acesso em 10 set. 2017.

ZHAO, W. et al. Impaired mitochondrial energy metabolism as a novel risk factor for selective onset and progression of dementia in oldest-old subjects. **Neuropsychiatric Disease And Treatment**, [s.l.], p.565-574, mar. 2015. Dove Medical Press Ltd. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.2147/ndt.s74898>> Acesso em 11 ago 2017.