

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

ANÁLISE DO GENE *GNPTAB* EM PACIENTES BRASILEIROS COM
MUCOLIPIDOSE II/III

NATANIEL FLORIANO LUDWIG

PORTO ALGRE
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

ANÁLISE DO GENE *GNPTAB* EM PACIENTES BRASILEIROS COM
MUCOLIPIDOSE II/III

NATANIEL FLORIANO LUDWIG

Orientador: Prof. Dr. Ida Vanessa D. Schwartz.

Co-orientador: Dr. Fernanda Sperb-Ludwig.

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

PORTO ALEGRE
2016

AGRADECIMENTOS

As minhas orientadoras, Ida Vanessa Doederlein Schwartz e Fernanda Sperb-Ludwig, que me conduziram com extrema capacidade e destreza pelo meu mestrado. Vocês possibilitaram e são responsáveis pelo meu crescimento profissional e pessoal nos últimos dois anos. Obrigado por contribuir para a minha carreira e permitir meu crescimento junto aos seus.

Aos meus amigos. Aqueles que estão por perto, compartilhando desse momento da minha vida. Mas também aqueles que não estão aqui ao meu lado, que minhas escolhas de vida os distanciaram de mim. A todos esses, agradeço por quebrar a rotina, por tornar pequenos momentos em grandes lembranças, por pertencer a minha história e também por possibilitar que eu pertença as suas.

Aos meus colegas do Centro de Terapia Gênica, Brain, Centro de Pesquisa Experimental e grupo de pesquisa com Mucopolidose, que nesses mais de dois anos contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal. Gostaria de agradecer pelas conversas sobre protocolos, sobre experimentos, sobre a carreira, sobre a vida e sobre o cotidiano. Pelos momentos de descontração, pelas brincadeiras e por fim, pela boa convivência.

A minha família. Simplesmente por tudo, sem vocês esse momento não seria possível. Obrigado pelo carinho, pela compreensão, pela dedicação, pelo amor e pelo apoio. Obrigado por estar aqui, por eu ter para onde voltar. Obrigado pelos exemplos de vida e de pessoas que vocês são para mim. Aos meus pais, obrigado por me ensinar a sonhar, por possibilitar que eu fosse atrás desse sonho, e por todo o apoio que vocês já me deram, que estão dando nesse momento e que ainda darão. Obrigado por me possibilitar o que vocês dois não tiveram. Tudo o que eu conquistei é de vocês, eu espero um dia poder retribuir.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Fundo de Incentivo a Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas (PPGCM) e a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) que possibilitaram que esse trabalho fosse desenvolvido.

RESUMO

Introdução: A rede lisossômica é um complexo de vias metabólicas que influenciam processos como degradação de organelas danificadas ou senescentes, processamento de antígenos, reutilização de aminoácidos essenciais e, em última instância, um sistema de fundamental importância para a fisiologia celular normal. Nesse contexto, os lisossomos possuem uma relevância muito grande, uma vez que é nessa organela que ocorre a destruição das moléculas envolvidas em todos os processos citados acima. Entre as unidades operacionais nos lisossomos estão as hidrolases lisossômicas, que são mais de 50 enzimas com capacidade, em ambiente ácido, de realizar a quebra de substratos específicos. A GlcNAc-fosfotransferase é um complexo hexamérico ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$) residente na porção *cis* do complexo de Golgi que realiza a adição de resíduos de manose-6-fosfato nas cadeias de oligossacarídeos das hidrolases lisossômicas. Com ação subsequente, a enzima descobridora realiza a remoção da manose, expõe os resíduos de fosfato e possibilita que as hidrolases sejam reconhecidas pelos receptores de manose-6-fosfato e direcionadas aos compartimentos lisossomais. As subunidades α e β da GlcNAc-fosfotransferase são codificadas pelo gene *GNPTAB*, localizado no cromossomo 12, constituído de 21 éxons, e a subunidade γ pelo gene *GNPTG*, localizado no cromossomo 16, constituído de 11 éxons. Alterações patogênicas em *GNPTAB* podem causar as doenças Mucopolidose II ou III alfa/beta e alterações em *GNPTG* causam a doença Mucopolidose III gama. O defeito genético leva à atividade residual, ou nula, da enzima que acaba por gerar o extravasamento das hidrolases lisossômicas ao meio extracelular e o acúmulo de substratos nos lisossomos. **Objetivos:** (1) caracterizar as alterações patogênicas em *GNPTAB* em um grupo de pacientes brasileiros não relacionados com Mucopolidose II ou III alfa/beta, e (2) definir um protocolo de pesquisa molecular para os pacientes brasileiros. **Metodologia:** É um estudo transversal, com amostragem por conveniência, e inclui pacientes com diagnóstico clínico e bioquímico de Mucopolidose II ou III. Foi extraído DNA genômico dos pacientes a partir de sangue obtido por punção venosa periférica. O gene *GNPTAB* foi sequenciado através da técnica de Sanger. As alterações do tipo troca de sentido foram analisadas pelos programas de Bioinformática Polyphen2, Sift e ConSurf, e as previstas como patogênicas foram pesquisadas em alelos controles brasileiros e analisadas por estudos funcionais, quando possível. A geração de construtos das alterações p.Ser385Leu e c.3503_3504delTC foi realizada por mutagênese sítio-dirigida

e a atividade residual destes foi avaliada 24 horas após expressão em células HEK. Para a análise financeira, valores atuais de equipamentos, reagente de biologia molecular e materiais plásticos foram utilizados para estimar o custo de uma extração de DNA, reação de PCR, purificação com PEG8000 e sequenciamento. **Resultados:** Foram incluídos 13 pacientes (ML II= 8; ML III= 5) e, adicionalmente, de uma mãe de paciente com diagnóstico clínico e bioquímico de ML II. A análise molecular identificou seis alterações patogênicas novas, as c.831delT, c.1763insA, c.1927delAATT, p.Ser385Leu, p.(Asp76Gly) e p.Try1111*. A análise de bioinformática das alterações do tipo troca de sentido as caracterizaram como prejudiciais para a função da proteína e os resíduos 76 e 385 como estrutural e funcional, respectivamente, além de ambos como altamente conservados entre as espécies. A análise funcional dos mutantes p.Ser385Leu e c.3503_3504delTC identificaram atividades residuais de 1,5% e nula, respectivamente. Também foram identificadas outras seis alterações patogênicas previamente descritas. A alteração c.3503_3504delTC foi a que apresentou a maior frequência (40%, n= 10/25 alelos), seguido pela p.Ile403The (12%, n=3/25 alelos). Quanto às relações genótipo-fenótipo, sete pacientes com ML II possuem genótipos combinados de alterações do tipo mudança de fase de leitura e sem sentido, enquanto que os cinco pacientes com ML III alfa/beta apresentam pelo menos uma alteração do tipo troca de sentido, o que evidencia a relação entre alterações que impactam a funcionalidade da proteína e fenótipos mais graves. A análise retrospectiva definiu o protocolo 1.0 que finalizaria o diagnóstico com um custo médio de R\$ 338,45, em uma amostra de 25 pacientes. A análise prospectiva do protocolo 2.0, sobre a mesma amostra de pacientes, indicou que o mesmo finalizaria o diagnóstico com o custo médio de R\$ 299,80, uma economia de 25%. **Discussão/Conclusão:** As novas alterações patogênicas descritas nesse trabalho confirmam a alta heterogeneidade alélica do gene *GNPTAB*. A análise funcional da alteração p.Ser385Leu confirma sua patogenicidade, que está de acordo com o fenótipo ML II do paciente, e evidencia a necessidade de mais estudos a fim de constatar o motivo desse resíduo ser importante para a proteína. A síntese dos protocolos demonstrou ser uma estratégia interessante e economicamente importante, uma vez que diminui os gastos envolvidos para finalizar o diagnóstico molecular.

Palavras chaves: *GNPTAB*, Mucopolioses II, Mucopolioses III alfa/beta, Alterações patogênicas, Diagnóstico molecular.

ABSTRACT

Introduction: The lysosomal network is a complex of metabolic ways that influence processes like damaged or senescent organelles degradation, antigen processing, essential amino acid reutilization, and, in the last instance, it is important for normal cell physiology. In this context, lysosomes have a great relevance since it is in this organelle that the destruction of the molecules involved in all the processes mentioned above occurs. The operational units in the lysosomes are the lysosomal hydrolases that are more than 50 enzymes with capacity, in an acid environment, to breakdown specific substrates. GlcNAc-phosphotransferase is a hexameric complex ($\alpha^2\beta^2\gamma^2$) located in the *cis* portion of the Golgi complex that performs the addition of mannose-6-phosphate residues in oligosaccharides chains on lysosomal hydrolases. In a subsequent way, the uncovering enzyme removes the mannose residues, exposes the phosphate residues, and enables the recognition of hydrolases by mannose-6-phosphate receptors. The α and β subunits are codified by *GNPTAB* gene, which is located in chromosome 12 and consists of 21 exons, and the γ subunit, encoded by *GNPTG* gene, that is located in chromosome 16 and consists of 11 exons. The consequences of pathogenic alterations in *GNPTAB* are Mucopolipidosis II or III alpha/beta diseases and alterations in the *GNPTG* are Mucopolipidosis III gamma disease. The genetic defect leads to residual or absent activity of enzyme which ultimately generates an overflow of lysosomal hydrolases to the extracellular environment and accumulation of substrates in lysosomes. **Objectives:** (1) to characterize, by sequencing of the *GNPTAB* gene, the pathogenic alterations in a group of unrelated Brazilian patients with Mucopolipidosis II or III alpha/beta, and (2) to define a molecular research protocol for Brazilian patients. **Methodology:** It is a cross-sectional study with convenience sampling, and it includes patients with biochemical and clinical diagnosis of Mucopolipidosis II or III. The DNA was amplified by PCR technique and sequencing by Sanger technique. All patients in the present study had all exons amplified. The missense alterations were analyzed by Polyphen2, Sift, and ConSurf softwares, and the alterations predicted as pathogenic were studied through research in Brazilian control alleles. The p.Ser385Leu and c.3503_3504delTC were evaluated by site-direct mutagenesis and the residual activity was evaluated 24 hours after expression in HEK cells, through radioactive assays. For cost-price analysis, current values for equipment, molecular biology reagents, and plastic materials were utilized to estimate the cost of DNA extraction, PCR reaction, PEG8000 purification,

and sequencing. **Results:** Of the 13 patients, 8 were clinically diagnosed with Mucopolidosis II and 5 with Mucopolidosis III alpha/beta and, additionally, a mother of one patient with biochemical and clinical diagnosis of Mucopolidosis II was also analyzed. The DNA analysis identified six novel pathogenic alterations in *GNPTAB*: c.831delT, c.1763insA, c.1927delAATT, p.Ser385Leu, p.(Asp76Gly), and p.Tyr1111*. The bioinformatics analysis of missense alterations were characterized as damaging for protein function, and residues 76 and 385 as structural and functional, respectively, and both as highly conserved among the species. The functional analysis of mutants p.Ser385Leu and c.3503_3504delTC showed the residual activity of GlcNAc-phosphotransferase of 1.5% and 0%, respectively. Six others pathogenic alterations previously described were also identified. The alteration c.3503_3504delTC showed the highest frequency (40%, n=10/25 alleles) followed by p.Ile403The (12%, n=3/25 alleles). The retrospective analysis defined the 1.0 protocol that finalized the molecular diagnosis at the cost of R\$ 338,45 per sample, in a group of 25 patients. The prospective analysis of 2.0 protocol, in the same patients, indicated that it would finalize diagnosis at the cost of R\$ 299,80 per sample, a saving of 25%. **Discussion/Conclusion:** The novel pathogenic alterations described confirm the high allelic heterogeneity of *GNPTAB* gene. In the genotype-phenotype relationship, 7 patients with Mucopolidosis II have combined genotype of frameshift or nonsense alterations, or both, and 5 Mucopolidosis III alpha/beta patients have at least one missense alteration, that shows the correlation between alterations that cause impact on the protein function and severe phenotype. The functional analysis of alteration p.Ser385Leu confirms its pathogenicity and makes evident the need of more studies in order to determine the reason this residue is so important for protein function. Protocol synthesis proves to be an interesting and economically important strategy, once it decreases costs to conclude the molecular diagnosis.

Keywords: *GNPTAB*, Mucopolidosis II, Mucopolidosis III alpha/beta, pathogenic alterations, molecular diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRATÉGIA DE BUSCA DE REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS SOBRE AS BASES QUE FUNDAMENTAM OS OBJETIVOS DESTE ESTUDO	14
FIGURA 2 - SISTEMA DE SÍNTESE E DIRECIONAMENTO DE HIDROLASES LISSÔMICAS AOS COMPARTIMENTOS LISSOSSOMAS.	16
FIGURA 3 - SÍNTESE DOS MARCADORES DE MANOSE-6-FOSFATO.....	18
FIGURA 4 - DOMÍNIOS IDENTIFICADOS NA PROTEÍNA DE <i>GNPTAB</i>	27

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DAS MUCOLIPIDOSES.....	25
TABELA 2 – FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES PATOGÊNICAS ENCONTRADAS NAS MUCOLIPIDOSES II E III ALFA/BETA.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

RE	Retículo endoplasmático
M6P	Manose-6-fosfato
MPR	Receptores de manose-6-fosfato
S1P	Proteína Site-1-protease
GlcNAc-fosfotransferase	<i>N</i> -acetylglucosamine-1-phosphotransferase
GlcNAc-1-fosfato	N-acetilglucosamina-1-fosfato
UDP-GlcNAc	Uridina Difosfato N-acetilglucosamina
Enzima descobridora	N-Acetylglucosamina-1-phosphodiester α -N-acetilglucosaminidase
α	Subunidade alfa da enzima <i>N</i> -acetylglucosamine-1-phosphotransferase
β	Subunidade beta da enzima <i>N</i> -acetylglucosamine-1-phosphotransferase
γ	Subunidade gama da enzima <i>N</i> -acetylglucosamine-1-phosphotransferase
ML	Mucopolidose(s)
MLII	Mucopolidose tipo II
MLIII	Mucopolidose tipo III
<i>GNPTAB</i>	Gene que codifica as subunidades α/β da enzima GlcNAc-fosfotransferase
<i>GNPTG</i>	Gene que codifica a subunidade γ da enzima GlcNAc-fosfotransferase
DL	Doenças Lisossômicas
EIM	Erros Inatos do Metabolismo
HR-M6P	Domínio de homologia ao receptor de M6P
α -MM	α -methyl D-mannoside

Sumário

1- Introdução.....	12
2- Revisão da Literatura	13
2.1 - Estratégias para localizar e selecionar as informações	13
2.2 - A rota Lisossômica	14
2.2 - Doenças Lisossômicas	20
2.3 - As Mucopolidoses II e III.....	22
2.3.1- Características Clínicas	24
2.3.2 - Bioquímica.....	25
2.3.3 - Genética	29
2.3.4 - Relação Genótipo – Fenótipo	31
2.3.5 - Epidemiologia	32
2.3.6 - Diagnóstico	33
2.3.7 - Tratamento	34
2.3.8 - Modelos Animais	36
3 - Justificativa	39
4 - Objetivos	40
4.1 Objetivo Principal	40
4.2 Objetivos Secundários	40
5 - Referências	41
6 - Artigos.....	47
6.1 - An update on the genotypic spectrum of ML II and III alpha/beta in Brazil: a description of 13 novel cases	47
6.2 - Desenvolvimento e avaliação de um protocolo para a pesquisa de alterações patogênicas em <i>GNPTAB</i> (artigo em desenvolvimento)	65
7 - Considerações Finais.....	85
8 - Perspectivas Futuras.....	89

1- Introdução

Lisossomos são atualmente organelas reconhecidamente reguladoras de vários processos fisiológicos importantes para a célula, logo, todo e qualquer problema específico relacionado a esta organela acarretará em doenças com características fisiológicas distintas. Sendo assim, as Doenças Lisossômicas (DL) são um grupo que abrange mais de 50 doenças, dentre essas as Mucopolidoses (ML) II e III alfa/beta são doenças autossômicas recessivas causadas por alterações patogênicas no gene *GNPTAB* (Biffi 2015; Coutinho 2015).

Este gene é responsável por codificar as subunidades α e β da enzima *N*-acetilglucosamina-1-fosfotransferase (EC: 2.7.8.17 – GlcNAc-fosfotransferase), o gene *GNPTG* é responsável por codificar a subunidade γ da enzima. A enzima, presente na porção *cis* do complexo de Golgi, realiza a transferência de um *N*-acetilglucosamina-1-fosfato (GlcNAc-1-fosfato) do doador Uridina Difosfato *N*-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) para o carbono na posição 6 do oligossacarídeo de manose, liberando um fosfodiéster, presente na hidrolase lisossômica. Em um segundo momento, na porção *trans* do complexo de Golgi, ocorre à remoção do resíduo de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) para a exposição do resíduo de manose-6-fosfato (M6P) que é realizado pela enzima *N*-acetilglucosamina-1-fosfodiéster α -*N*-acetilglucosaminidase (EC: 3.1.4.45 – enzima descobridora) (Braulke, Raas-Rothschild, and Kornfeld 2015; Sabatini and Adesnik 2015).

Localizado no cromossomo 12q23.2, o gene *GNPTAB* é constituído de 21 éxons e seu transcrito precursor α/β apresenta 1256 aminoácidos e 190 kDa. A proteína precisa sofrer clivagem no complexo de Golgi para formar as subunidades α e β maduras. Já *GNPTG* está localizado no cromossomo 16p13.3 e é composto por 16 éxons e seu transcrito é formado por 305 aminoácidos (Coutinho 2014; Franke, Braulke, and Storch 2013; Raas-Rothschild et al. 2000; Tiede et al. 2005).

Alterações patogênicas em *GNPTAB* em que o transcrito mutante resultante apresente atividade enzimática residual nula, ou muito baixa, são associadas à forma mais grave da doença, a ML II (MIM #252500). Já alterações em que o transcrito apresente atividade enzimática residual entre 2-10% estão associadas a ML III alfa/beta (MIM #252600). Alterações patogênicas em *GNPTG* estão associadas à doença ML III

gama (MIM #252605) (Cathey et al. 2008; Cathey et al. 2010; Cury et al. 2013; Encarnação et al. 2009; Kudo, Brem, and Canfield 2006).

As MLs são doenças graves, que acarretam em acometimento neurológico, afetam crianças, ainda não possuem tratamento específico disponível e o conhecimento sobre a proteína selvagem, como suas porções catalíticas, ainda não estão totalmente estabelecidas. Nesse contexto, a informação molecular tem importância fundamental para o fomento de novos indícios sobre os domínios funcionais da GlcNAc-fosfotransferase, para gerar conhecimento para aplicação de possíveis futuras terapias e para possibilitar o aconselhamento genético aos pais.

2- Revisão da Literatura

2.1 - Estratégias para localizar e selecionar as informações

Esta revisão da literatura está focada nos aspectos relacionados às principais características da via lisossomal e das ML – aspectos clínicos, diagnósticos, genéticos, epidemiológicos, de tratamento e de modelos animais. A estratégia de busca envolveu a base de dado PubMed até março de 2016. Foram realizadas buscas através dos termos “Mucopolidose II and III”, “GlcNAc-1-phosphotransferase”, “pathogenic alterations”, “*GNPTAB*”, “*GNPTG*”, “I-cell disease”, “Inborn Errors Metabolism”, “Lysosomal Diseases”, e suas combinações, apresentadas na Figura 1.

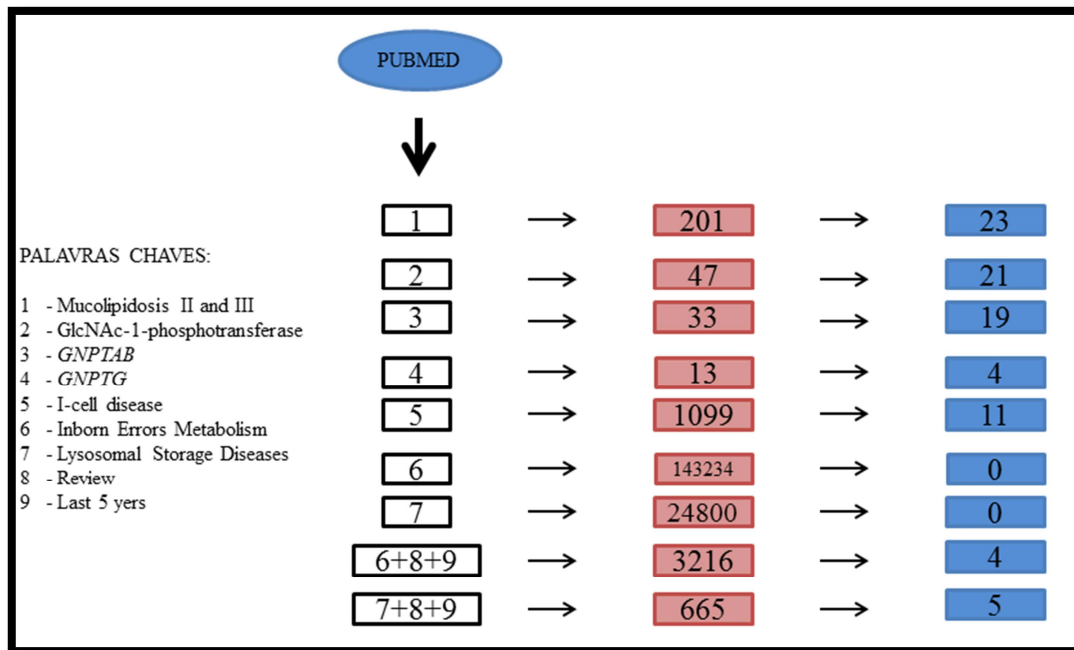


Figura 1 - Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo. Caixas em azul indicam os artigos que foram incluídos na revisão de acordo com os critérios de inclusão.

2.2 - A rota Lisossômica

Lisossomos são organelas citoplasmáticas delimitadas por membranas que possuem em seu interior uma grande variedade de enzimas, as hidrolases lisossômicas, que quando em ambiente ácido realizam a degradação de todos os tipos de macromoléculas biológicas essenciais à fisiologia celular. A origem do material para degradação presente no interior dessas organelas pode ser advinda da via de endocitose e, ou, de componentes celulares da via autofágica (Sabatini and Adesnik 2015).

O conteúdo de um lisossomo pode determinar sua forma, tamanho e morfologia, da mesma maneira que o estágio em que a degradação encontra-se também influi nesses aspectos. Uma célula normal pode apresentar algumas centenas de lisossomos, todos apresentando diferenças entre si, mas todos realizando o mesmo processo biológico (Hu et al. 2015; Luzio et al. 2014; Sabatini and Adesnik 2015).

A síntese de lisossomos é um processo complexo e não bem entendido, onde uma série de etapas específicas é necessária para que as mais de 50 hidrolases lisossômicas e 100 proteínas de membrana, quase sempre sintetizadas no retículo

endoplasmático (RE), sejam enviadas aos compartimentos lisossomais (Luzio et al. 2014).

Os compartimentos lisossomais podem ser classificados em endossomos precoces e tardios, corpos multivesiculares e lisossomos, de acordo com a aparência morfológica, localização celular, composição bioquímica, acidez e densidade (Figura 2). Endossomos precoces normalmente estão localizados na periferia da célula, próximos da membrana citoplasmática, e são os compartimentos no qual moléculas internalizadas são mantidas. Apresentam um pH intraluminal levemente ácido, que é importante para a desconexão do complexo partícula internalizada-receptor de membrana, o qual pode voltar à membrana da célula para novas rodadas de internalização (Hu et al. 2015; Luzio et al. 2014).

O resultado desse processo é a formação de várias vesículas internas, os corpos multivesiculares, que são importantes para a transição de endossomos precoces para endossomos tardios. Além de uma mudança importante na composição das proteínas de membrana, esse processo faz com que as organelas se movam para a região perinuclear, com aumento da concentração de hidrolases lisossômicas e diminuição progressiva do pH intraluminal. Posterior a este processo, ocorre a fusão dos endossomos tardios/corpos multivesiculares com o lisossomo e a degradação dos materiais é realizada (Hu et al. 2015; Luzio et al. 2014).

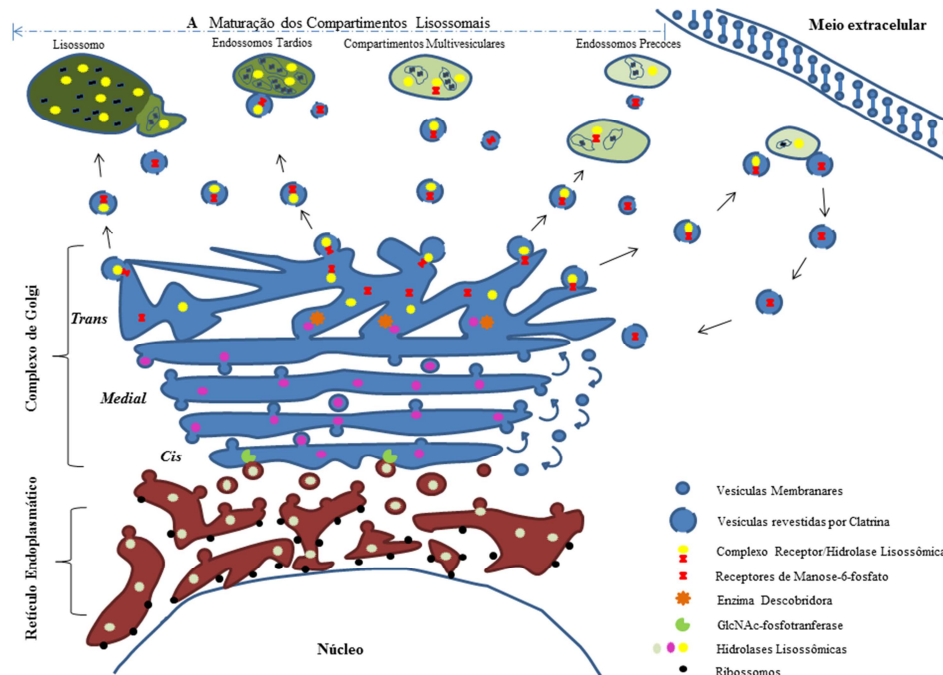


Figura 2 - Sistema de Síntese e Direcionamento de Hidrolases Lisossômicas aos compartimentos Lisossomais (adaptado de Sabatini & Adesnik, 2015). A síntese de Hidrolases Lisossômicas é realizada por ribossomos que estão associados à face citoplasmática da membrana do Retículo Endoplasmático (RE) rugoso, a sequência de polipeptídios (círculos brancos) é então sinalizada à internalização por Vesículas Membranares (VM) que emergem da membrana do RE liso. Após a internalização, as VM contendo as hidrolases lisossômicas se direcionam e são fusionadas a membrana da porção *cis* do complexo de Golgi, e é nessa região que a enzima GlcNAc-fosfotransferase adiciona o marcador de manose-6-fosfato (M6P) nas glicoproteínas (círculos rosa) que serão enviadas aos compartimentos lisossomais. O passo seguinte é o transporte das hidrolases lisossômicas, também em VMs, através do Complexo de Golgi em direção à porção *Trans*, onde a enzima descobridora realiza a remoção do N-acetilglucosamina (GlcNAc) e expõe os resíduos de M6P nas enzimas lisossomais (círculos amarelos). Receptores de M6P (MPRs) livres e circulantes reconhecem e se ligam as hidrolases lisossômicas, o complexo é incorporado em Vesículas cobertas por Clatrina que emergem da membrana da porção *Trans* do complexo de Golgi. Essas vesículas viajam aos compartimentos lisossomais, são reconhecidas na face citoplasmática da membrana e internalizadas, onde o ambiente intraluminal ácido ocasiona a liberação do ligante pelo receptor, que pode então voltar à porção *Trans* do complexo de Golgi e realizar novos turnos de entrega de hidrolases lisossômicas. A entrega pelas vesículas cobertas por clatrininas pode ser para qualquer um dos compartimentos lisossomais presentes no citoplasma celular, o que parece diferir é a riqueza quantitativa de hidrolases lisossômicas e os MPRs utilizados para a entrega entre os diferentes compartimentos. **A.** Maturação dos compartimentos lisossomais, onde o aumento gradual da acidez (intensidade da cor verde), do conteúdo quantitativo de hidrolases lisossômicas (círculos amarelos) e do posicionamento dos compartimentos (proximidade ao núcleo) indica maturação. **RE.** Retículo endoplasmático. **Cis.** Porção *Cis* do complexo de Golgi. **Medial.** Porção *Medial* do complexo de Golgi. **Trans.** Porção *Trans* do complexo de Golgi.

Parte importante para o funcionamento da rota lisossômica, as hidrolases lisossômicas são sintetizadas por ribossomos presentes na membrana do RE e possuem marcas na porção N-terminal que sinalizam para o lúmen desta organela, processo no qual recebem cadeias de oligossacarídeos de manose e posterior clivagem da sequência sinal. A maioria das hidrolases lisossômicas é classificada como glicoproteínas, o que acaba por impossibilitar a distinção destas das glicoproteínas que serão secretadas da célula (Sabatini and Adesnik 2015).

O processo no qual as hidrolases lisossômicas são enviadas aos lisossomos e não secretadas para o meio extracelular, ocorre no complexo de Golgi. As glicoproteínas são transportadas através de elementos de transição, que são cisternas especializadas oriundas do RE e que estão localizadas próximas da face recebedora (*cis*) do complexo de Golgi. Vesículas emergem da parte “suave” do RE e, na presença de proteínas secretórias específicas, realizam o transporte em um processo dependente de energia (Figura 3) (Sabatini and Adesnik 2015).

Já na porção *cis* do complexo de Golgi, as hidrolases lisossômicas recebem os marcadores responsáveis por possibilitar que estas enzimas adentrem ao lisossomo, chamados de M6P. A adição deste marcador ocorre pela ação sequencial de duas enzimas, num primeiro momento a enzima GlcNAc-fosfotransferase catalisa a transferência de um GlcNAc-1-fosfato do doador UDP-GlcNAc para o carbono na posição 6 do oligossacarídeo de manose, o que libera um fosfodiéster, presente na hidrolase lisossômica. O passo seguinte ocorre na porção *trans* do complexo de Golgi e consiste na remoção do GlcNAc para a exposição do resíduo de M6P que é realizado pela enzima descobridora (Figura 3) (Braulke, Raas-Rothschild & Kornfeld, 2015; Sabatini & Adesnik, 2015).

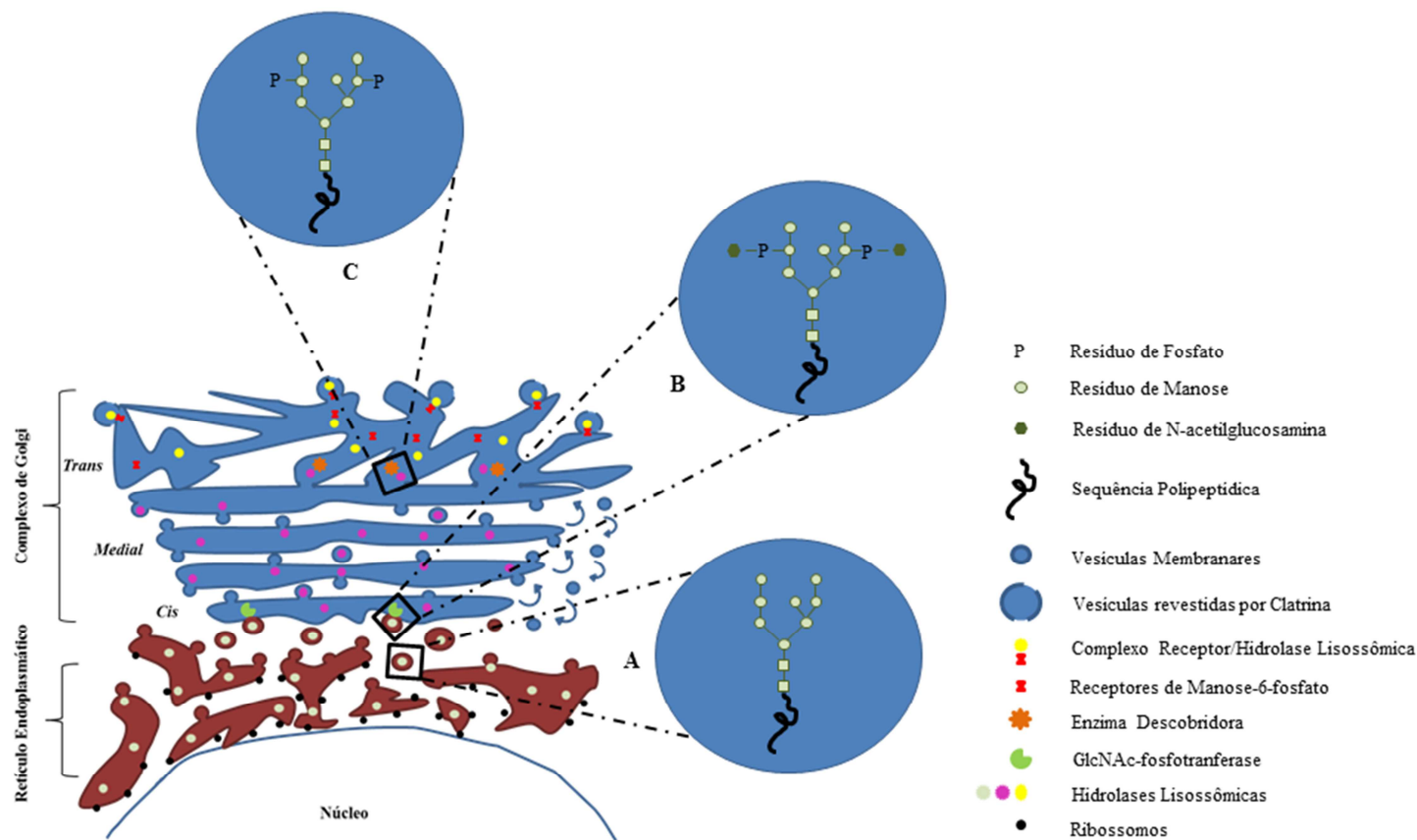


Figura 3 - Síntese dos Marcadores de Manose-6-fosfato (Adaptado de Braulke et al., 2015; Sabatini & Adesnik, 2015). Proteínas sintetizadas no RE viajam a porção *cis* do complexo de Golgi em vesículas membranares (A), onde a enzima GlcNAc-fosfotransferase adiciona resíduos de N-acetilglucosamina-fosfodiéster (GlcNAc-fosfodiéster) (B) nas glicoproteínas que serão direcionadas aos compartimentos lisossomais. Essas proteínas percorrem o complexo de Golgi em direção à porção *Trans* da organela, onde a enzima descobridora realiza a remoção do GlcNAc e expõe os resíduos de fosfato (C), possibilitando assim que as hidrolases lisossômicas sejam reconhecidas pelos receptores de manose-6-fosfato e prossigam aos compartimentos lisossomais através das vesículas cobertas por Clatrina. **A.** Sequência polipeptídica sintetizadas no RE e que apresenta cadeias de oligossacarídeos. **B.** Hidrolases lisossômicas apresentam resíduos de GlcNAc-fosfodiéster nos oligossacarídeos. **C.** Hidrolases lisossômicas apresentam resíduos de manose-6-fosfato nos oligossacarídeos. **RE.** Retículo endoplasmático. **Cis.** Porção *Cis* do complexo de Golgi. **Medial.** Porção *Medial* do complexo de Golgi. **Trans.** Porção *Trans* do complexo de Golgi.

A especificidade da GlcNAc-fosfotransferase por alguma característica das hidrolases lisossômicas é o fator chave para a adição de marcadores M6P em glicoproteínas endereçadas ao lisossomo e não em polipeptídios importantes para outras funções. Muitas hidrolases lisossômicas já tiveram suas sequências clonadas, mas nenhuma similaridade significativa foi encontrada. Como existem várias cadeias de oligossacarídeos nas hidrolases lisossômicas e a fosforilação pode ocorrer em mais de uma delas, a GlcNAc-fosfotransferase parece reconhecer uma característica global da proteína e não alguma específica próxima a uma das cadeias (Bräulke et al., 2015; Coutinho, 2014; Sabatini & Adesnik, 2015).

Os resíduos de M6P que permitem o direcionamento das hidrolases lisossômicas aos compartimentos lisossomais são reconhecidos por dois tipos de receptores (MPR), que apresentam diferenças quanto a propriedades e necessidade de cátions divalente para ligação. O MPR300 é uma glicoproteína transmembrana tipo I que pode variar entre 275-300 kDa de tamanho. Esta glicoproteína apresenta o sítio ativo no domínio luminal, e necessita de um ambiente com pH neutro, mas não requer cátions, para que a ligação com o ligante ocorra. Estudos demonstraram que grande parte da concentração desse receptor ocorre em membranas intracelulares de vesículas revestidas, endossomos e complexo de Golgi, mas também é encontrado em pequenas quantidades na membrana plasmática. A superexpressão de MPR300 em modelos *knockout* para esse receptor, foi capaz de restaurar o envio de hidrolases lisossômicas aos lisossomos e a capacidade de internalização de hidrolases do meio extracelular (Bräulke, Raas-Rothschild, and Kornfeld 2015; Sabatini and Adesnik 2015).

O MPR46 também é uma glicoproteína transmembrana tipo I que requer um pH mais ácido (6.3) e cátions divalentes, principalmente Mn^{2+} , para que a ligação com o ligante ocorra. Porém essa necessidade aparenta ser espécie-específica, uma vez que há indícios que as formas humanas não necessitam dos cátions. O gene é traduzido como uma proteína de 46 kDa com um domínio citoplasmático de 69 resíduos e homologia ao MPR300 quanto à porção luminal. Atua no envio de algumas enzimas lisossômicas aos compartimentos lisossomais, porém com eficiência reduzida. Estudos de superexpressão deste receptor em células normais induziram o aparecimento de grandes quantidades de hidrolases lisossomais no meio extracelular, sugerindo que o MPR46 possa ter alguma função na secreção destas glicoproteínas, porém, esses receptores não estão presentes na

membrana plasmática (Braulke, Raas-Rothschild, and Kornfeld 2015; Sabatini and Adesnik 2015).

Até o presente momento não existem evidências da ocorrência dos MPRs em lisossomos maduros, bem como não é totalmente definido a distribuição dos dois receptores na célula. O determinante para a função específica de cada um dos receptores parece ser o pH e a afinidade pelo ligante. Enquanto que em ambientes com pH neutro ou ligeiramente ácidos a ligação ao ligante é forte, em pH fortemente ácido ocorre a liberação do ligante pelo receptor. Isso explicaria o fato do MPR300 ser mais eficiente no envio de hidrolases lisossômicas aos compartimentos lisossomais tardios, organelas com ambiente fortemente ácido. Já os MPR46 enviariam as mesmas enzimas para endossomos precoces, que são organelas com pH mais próximo ao básico e que facilitariam a saída destas para o meio extracelular (Braulke, Raas-Rothschild, and Kornfeld 2015; Hu et al. 2015; Luzio et al. 2014; Sabatini and Adesnik 2015).

Logo após a adição dos marcadores de M6P ser finalizada, os MPRs reconhecem as hidrolases lisossômicas marcadas e realizam a ligação. A maneira como o complexo MPR-hidrolase lisossômica são transportados até os compartimentos lisossomais não é totalmente estabelecida. Mas há consenso que MPRs ligados a hidrolases lisossômicas emergem do complexo de Golgi, mais especificamente na porção *Trans*, e são reconhecidas por adaptadores que realizam a incorporação do complexo em vesículas cobertas por clatrina. Essas vesículas são então encaminhadas e fusionadas com os compartimentos endossomais. Assim que o complexo é liberado no meio luminal destes compartimentos, ocorre a desconexão entre MPR e hidrolase lisossômica em função do ambiente ácido. Os MPRs podem então voltar à rede *trans* do Complexo de Golgi e realizar o transporte de outras hidrolases (Figura 2) (Braulke, Raas-Rothschild, and Kornfeld 2015; Sabatini and Adesnik 2015).

2.2 - Doenças Lisossômicas

Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são um grupo de doenças determinadas geneticamente, em que uma enzima deficiente produz bloqueio bioquímico que pode levar a consequências patológicas (Argmann et al. 2015). É um grupo com grande

variedade de doenças que, embora individualmente raras, possuem prevalência cumulativa de 1:1,000 até 1:2,500 nascidos vivos (Wager, Mahmood, and Russell 2014).

Os EIMs podem ser divididos em três grandes domínios baseados no tipo de defeito metabólico. No primeiro estão as doenças que envolvem organelas e moléculas complexas, estas incluem as DLs e os defeitos de síntese de colesterol. No segundo grupo estão as doenças de metabolismo intermediário que levam ao acúmulo tóxico de metabólitos ou metais adjacentes ao defeito enzimático, estas incluem as acidúrias orgânicas e defeitos no ciclo da ureia. O grupo final envolve o metabolismo energético celular, que afeta a produção e utilização da energia e pode ser dividido em doenças mitocondriais e citoplasmáticas. Cada doença nestas diferentes categorias ocorre devido a um distinto defeito genético em uma via metabólica particular, que invariavelmente leva a uma disfunção celular (Wager, Mahmood, and Russell 2014).

Descrito inicialmente por de Duve et al., (1954) como um compartimento para degradação de várias macromoléculas dentro da célula, os lisossomos hoje são cientificamente reconhecidos como um regulador central da homeostase metabólica, onde através de sua ação é coordenada uma rede complexa e interativa de organelas celulares. Por esse motivo, problemas relacionados ao funcionamento do lisossomo refletem, conseqüentemente, em desestabilização de várias vias metabólicas celulares (Coutinho & Alves, 2015; van Meel, Qian & Kornfeld, 2014).

DLs é um grupo de doenças metabólicas hereditárias de armazenamento, caracterizadas pelo acúmulo progressivo de materiais não, ou parcialmente, digeridos nos lisossomos de células afetadas. Nesse grupo estão reunidas mais de 60 doenças distintas. A grande maioria das DLs são doenças autossômicas recessivas, decorrentes da deficiência de proteínas lisossômicas e caracterizadas como crônicas, progressivas e que apresentam um amplo espectro de sintomas (Biffi, 2015; Coutinho & Alves, 2015).

O acúmulo de substratos nos lisossomos pode levar à perda da função metabólica e celular, o que dependerá do grau funcional da proteína deficiente, resultado de alterações patogênicas específicas, da bioquímica dos materiais que acabam por ser acumulados e do tipo celular onde este acúmulo ocorre. Tecidos como o muscular e o ósseo, os órgãos fígado e rim, e inclusive o sistema nervoso central podem ser afetados. Para a maioria das DLs, baixos níveis da proteína mutante são relacionados

com fenótipos clínicos leves e portadores permanecem em grande parte como não afetados (Coutinho & Alves, 2015).

A importância dos lisossomos para a fisiologia celular é evidente quando mais de 50 doenças genéticas estão relacionadas a esta organela, com uma estimativa de afetar 1 nascido vivo a cada 4.000-9.000 nascimentos (Biffi, 2015; Coutinho & Alves, 2015).

2.3 - As Mucopolidroses II e III

As ML são doenças genéticas raras com padrão de herança autossômico recessivo, caracterizadas por apresentar defeitos na atividade da enzima GlcNAc-fosfotransferase. Descrita pela primeira vez em 1970 pelos pesquisadores Spranger e Wiedemann, os pacientes podem ser classificados em três doenças diferentes, a ML II (ML II - MIM #252500), a ML III α/β (ML III α/β ; ML IIIA; MIM #252600) e a ML III γ (ML III γ ; ML IIIC; MIM #252605). A classificação entre as três doenças distintas é realizada de acordo com o diagnóstico clínico (Braulke et al., 2015; Cathey et al., 2008).

Uma das características fisiopatológicas mais marcantes nos pacientes com ML é a presença de vários vacúolos ao longo do citoplasma. Uma vez que as células não apresentam a correta marcação com os resíduos de M6P, todas as hidrolases lisossômicas que deveriam ser enviadas aos compartimentos lisossomais, através dessa via, falham em ser reconhecidas pelos MPR na porção *trans* do complexo de Golgi. Conseqüentemente, as hidrolases lisossômicas acabam sendo extravasadas para o meio extracelular e nos lisossomos há o acúmulo de uma grande diversidade de materiais, que formam os vacúolos nas células que são visíveis por microscopia e que originalmente deram o nome a doença de *Inclusion Cell* (Boonen et al., 2011; Braulke et al., 2015; Otomo et al., 2009; Otomo et al., 2011).

Estudos para caracterização do material presente nos vacúolos das células dos pacientes de ML identificaram, até o presente momento, grandes quantidades de gangliosídeos GM2, glicoconjugados de *acid- α -2-3galactose* e *galactose- β 1-4N-acetilglucosamina*, resíduos de manose, oligossacarídeos, glicoproteínas, glicolípídeos e acúmulo do aminoácido cisteína (Greene et al. 1985; Tietze & Butler 1979).

Fosfolipídios e colesterol total também estão acumulados em torno de duas vezes mais em fibroblastos afetados quando comparado com controles (Otomo et al., 2011). Também se demonstrou o acúmulo de material não digerido de organelas citoplasmáticas, particularmente mitocôndrias (Boonen et al. 2011; Kawashima et al. 2007).

Fibroblastos de pacientes com MLII também apresentam um aumento na quantidade de autofagossomas, que é modesto em células de pacientes com MLIII, quando comparadas com controles. Mais especificamente, se observa um aumento da proteína LC3-II, um marcador de formação de autofagossomas, e não da proteína Beclin-1, conhecidamente uma reguladora da autofagia. A presença de estruturas positivas para LC3-II é encontrada preferencialmente no citosol celular e parcialmente co-localizadas com marcadores de lisossomo, e é frequentemente mais encontrada em células de pacientes com MLII do que com MLIII. Também se observa um acúmulo de proteínas p62, sabidamente envolvidas na autofagia, co-localizadas com lisossomos (Otomo et al., 2009).

O pH lisossômico está alterado em células de pacientes com MLII (pH= 5,29±0,08) quando comparado com controles (pH= 4,79±0,10), e esse aumento é dependente do nível de acúmulo de material na célula. Fibroblastos de pacientes de ML também apresentam três vezes mais lisossomos do que controles (Otomo et al., 2011).

A função mitocondrial também está deficiente em células de pacientes com MLII. Experimentos demonstraram que essas células apresentam estruturas mitocondriais fragmentadas e que a função mitocondrial é corrigida quando as células são tratadas com drogas inibidoras de formação de autofagossomas (Otomo et al., 2009).

Os pacientes com ML também podem apresentar problemas no sistema imunológico, uma vez que a função lisossomal é importante nas células que realizam a apresentação de antígenos. As catepsinas B, H e S, por exemplo, estão envolvidas na via de degradação de antígenos em compartimentos lisossomais e apresentação destes através do complexo de histocompatibilidade II. Mais, o processamento de antígenos por essa via não pode ser realizada sem a função das catepsinas (Otomo et al., 2015; Sadegh-Nasseri & Kim 2015).

Otomo et al. (2015) demonstraram que a função de captar antígenos não está defeituosa em linfócitos B nem em células dendríticas de pacientes com ML. Porém, quanto ao processamento proteolítico dos antígenos, para posterior apresentação para os linfócitos T, os linfócitos B apresentaram problemas que significaram uma redução de 48% de moléculas do complexo de histocompatibilidade na sua superfície. Pacientes também apresentaram uma contagem total de linfócitos B diminuída, e a proporção de linfócitos B de memória é menor do que seus equivalentes imaturos. Baixas concentrações de Imunoglobulinas (Ig), entre elas as IgG, IgA e IgM, também foram evidenciadas em pacientes com ML.

Em conclusão, os autores afirmam que a função de apresentação de antígenos nos linfócitos B está defeituosa e que a consequente cooperação com linfócitos T é restrita, e em consequência há diminuição da maturação dos linfócitos B. O contexto é explicável pelo baixo nível de atividade de importantes proteases, onde o acúmulo de materiais não degradados nessas células pode contribuir para o fenótipo fisiopatológico identificado. Possivelmente, essas características previnem o sistema imunológico de responder de forma eficaz contra patógenos, fato evidenciado pela baixa resposta a vacinas por parte dos pacientes (Otomo et al., 2015).

Outro fato interessante sobre o defeito presente nos pacientes com ML é a presença de algumas hidrolases lisossomais, β -glucocerebrosidase e fosfatase ácida, em níveis normais nas células, como hepatócitos, células de Kupfer e leucócitos, e em alguns órgãos como cérebro, fígado, baço e rim (Boonen et al. 2011; Braulke, Raas-Rothschild, and Kornfeld 2015; DiCioccio and Miller 1991; Owada and Neufeld 1982; Rijnboutt et al. 1991). Essas observações, também encontradas em outras espécies, sugerem que um mecanismo secundário, independente da via de M6P, realize o direcionamento dessas hidrolases aos lisossomos (Coutinho, Prata, & Alves 2012; Markmann et al., 2015; Reczek et al., 2007).

2.3.1- Características Clínicas

A ML II é uma doença grave e progressiva com a possibilidade de apresentar sintomas antes do nascimento e ser fatal ainda na primeira década de vida. Os pacientes apresentam face infiltrada típica, hiperplasia gengival, hérnias inguinais, *disostose*

múltipla, baixa estatura, anormalidades craniofaciais e surdez, algumas dessas características clínicas podem ser visíveis ao nascimento. A doença evolui de forma rápida e é evidente no atraso de crescimento, que normalmente diminui no primeiro e inexistente no segundo ano de vida. Atraso de desenvolvimento, com prejuízo no desenvolvimento cognitivo e habilidades na linguagem receptiva (expressão verbal limitada a poucas palavras), aumento da imobilidade das articulações e desenvolvimento de deformidades nas mãos (em garra) também podem ser identificadas nos pacientes. Complicações cardiorrespiratórias normalmente são a causa de morte dos pacientes (Braulke, Raas-Rothschild, and Kornfeld 2015; Cathey et al., 2010).

As ML III alfa/beta e III gama apresentam características clínicas mais leves que os pacientes com ML II e, além disso, a evolução é mais lenta, o que permite que estes sobrevivam até a idade adulta. A ML III gama apresenta um curso progressivo mais leve do que a ML III alfa/beta. As primeiras manifestações normalmente são a rigidez das articulações das mãos e ombros, escoliose, baixa estatura e as “mãos em garra” já nos primeiros anos de vida. Não foram encontradas anormalidades no período gestacional. Problemas cardíacos podem ocorrer a partir da primeira década de vida e o desenvolvimento cognitivo é normal ou levemente prejudicado em alguns pacientes (Braulke, Raas-Rothschild, and Kornfeld 2015).

Tabela 1 – Características Clínicas das Mucopolioses II e III

Características	Mucopoliosose II	Mucopoliosose III
Crescimento Intrauterino	Baixo/Normal	Normal
Início dos Sintomas	Nascimento/Primeiros anos de vida	Primeiros anos de vida/Adolescência
Acometimento Neurológico	Sim	Não/Muito leve
Acometimento Ósseo	Sim	Sim
Defeito Genético	<i>GNPTAB</i>	<i>GNPTAB/GNPTG</i>
Atividade Residual Enzimática	<2%	>2%

2.3.2 - Bioquímica

Purificada parcialmente pela primeira vez em 1981 pelos pesquisadores Kornfeld e Reitman, o complexo enzimático totalmente puro foi alcançado apenas em 1996 por Bao et al. através da purificação de tecido bovino. A GlcNAc-fosfotransferase

é um complexo hexamérico de 540 kDa composto de três diferentes subunidades, duas α , duas β e duas γ .

O precursor α/β é traduzido no RE como uma proteína de membrana tipo III N-glicosilada que apresenta 1256 aminoácidos e 190 kDa. O precursor apresenta nas porções N- e C-terminais um sinal $^5\text{Leu-Leu}^6$ e um motivo $^{1253}\text{Arg-Ile-Arg}^{1255}$, respectivamente, que sinaliza para seu transporte por vesículas até o complexo de Golgi. Através da clivagem proteolítica pela site-1-protease (S1P) entre as posições Lys928 e Asp929, as subunidades α e β ativas são formadas em 145 e 45 kDa de massa, respectivamente. A função catalítica do complexo GlcNAc-fosfotransferase é dependente de cálcio e está presente nas porções α e, ou, β (Coutinho 2014; Franke, Braulke, & Storch, 2013; Tiede et al., 2005).

Através de similaridade da sequência proteica das subunidades da GlcNAc-fosfotransferase com outras proteínas, tem se identificado domínios presente neste complexo polipeptídico. No transcrito selvagem do gene *GNPTAB* foram identificados os domínios *Stealth* (similares a proteínas de biossíntese de cápsulas bacterianas), *Nocth repeat-like* (função desconhecida), DMAP (parece se associar a proteínas lisossomais) e o domínio de ligação a *GNPTG* (Figura 4) (De Pace et al., 2015; Qian et. al., 2013; Tzeng, Noble & Stephens, 2003).

A subunidade α madura humana é uma proteína de membrana tipo II que compreende 928 aminoácidos. É constituída de uma extremidade N-terminal de 19 aminoácidos, um domínio transmembrana de 22 aminoácidos e um subsequente domínio luminal compreendendo 886 resíduos. Também apresenta 17 potenciais sítios de N-glicosilação. Nesta subunidade foram identificados os domínios *Stealth*, *Nocth repeat-like*, DMAP e o domínio *GNPTG binding* (Kudo, Brem, & Canfield 2006; Tiede et al., 2005).

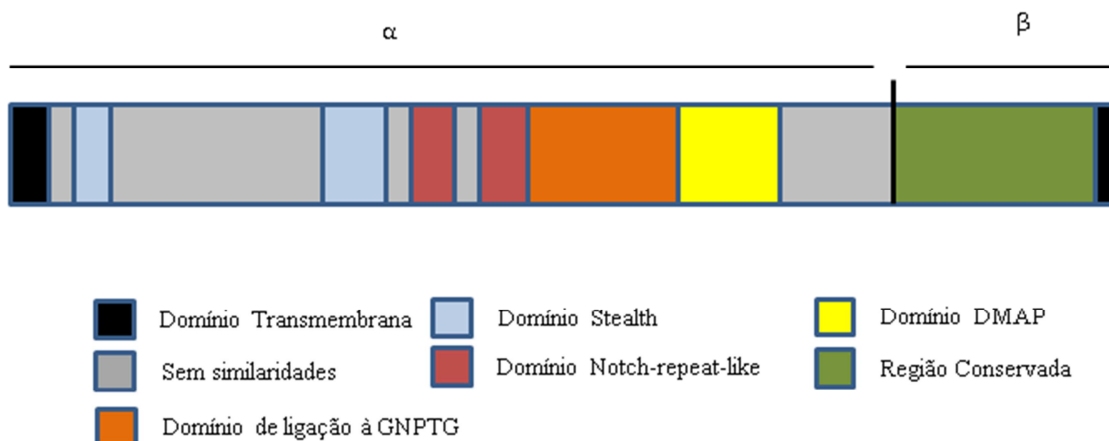


Figura 4 - Domínios identificados na proteína de *GNPTAB* (adaptado de Velho et al., 2015). A posição do sítio de clivagem da Site-1- protease entre os aminoácidos Lys928 e e Asp929 (linha preta) para formar as subunidades α/β está demonstrado.

Na parte luminal da subunidade α se encontram dois domínios com similaridade a proteínas de biossíntese de cápsulas bacterianas, denominados *Stealth* (Tzeng, Noble, & Stephens 2003). Ainda se desconhece a função dessas duas regiões, entre os resíduos 75-86 e 322-421. Os estudos de expressão realizados com alterações patogênicas descritas em pacientes demonstraram resultados variados, alguns mutantes apresentavam localização apenas no RE, demonstrando retenção total da proteína resultante e consequentemente atividade enzimática nula. Outros apresentavam localização apenas no complexo de Golgi, o que evidencia o correto transporte da proteína, mas não garante a formação das subunidades α e β maduras, o que é suportado pelas atividades enzimáticas variadas, desde normais, diminuídas e até nulas para mutantes que apresentam essa característica. E por fim, alguns mutantes apresentam co-localização nas duas organelas e resultados variados para as atividades enzimáticas (De Pace et al. 2014; Qian et al. 2014; Velho et al. 2015).

O transcrito selvagem da GlcNAc-fosfotransferase também apresenta dois domínios denominados *Notch-repeat-like*, o primeiro entre os resíduos 433-474 e o segundo entre os 500-535. Mutantes do domínio *Notch-repeat-like 1* (p.Cys442Tyr, p.Cys461Gly e p.Cys468Ser) são enviados ao complexo de Golgi e sofrem clivagem por S1P, porém apresentam atividade enzimática reduzida ($18\pm 16\%$, $15\pm 7\%$ e $18\pm 10\%$, respectivamente). Já mutantes presentes no domínio *Notch-repeat-like 2* (p.Cys505Tyr e p.Cys523Arg) resultaram em parcial retenção no RE, conseqüente redução nos níveis de

subunidade β e atividade enzimática. Mutantes com ambos os domínios excluídos são expressos normalmente, localizados no complexo de Golgi e apresentam atividade catalítica em α -methyl D-mannoside (α -MM), mas não em diversas hidrolases lisossomais. A importância de cada um dos domínios é dependente da hidrolase em questão, bem como a atividade residual resultante (van Meel et al. 2016; Qian et al. 2014; Velho et al. 2015).

É na subunidade α que se encontra o domínio no qual a subunidade γ se liga para formar o complexo hexamérico da GlcNAc-fosfotransferase, mais precisamente entre os resíduos 645 e 698. Denominado como *GNPTG binding*, é possível que a proximidade deste sítio ao domínio DMAP possibilite o aumento na eficiência da atividade da GlcNAc-fosfotransferase, função esta que vem sendo atribuída a subunidade γ (De Pace et al. 2015).

Estudos de expressão demonstraram que proteínas contendo um domínio DMAP se associavam a hidrolases ácidas, como Catepsina D e α -iduronidase, porém não a proteínas não lisossomais. Trabalhos com o mutante p.Lys732Asn da GlcNAc-fosfotransferase demonstraram que o mesmo não altera a montagem, a localização no complexo de Golgi, a clivagem por S1P, a ligação com a subunidade γ e a estabilidade do complexo hexamérico. Resultados iguais foram encontrados para o mutante com deleção dos resíduos 438-819, onde se encontra o domínio DMAP. Contudo, quando analisada a atividade enzimática do mutante para hidrolases lisossomais, como Catepsina D e α -iduronidase, a mesma apresentava apenas de 12%-15% de eficiência quando comparada ao transcrito selvagem. Resultados similares foram encontrados para o mutante p.Leu785Trp (Qian et al. 2013, 2014).

Há evidências de que os domínios *Notch-repeat-like 1* e *2* e DMAP, em conjunto com a subunidade γ , realizem a função de reconhecimento e ligação a diferentes hidrolases lisossomais. Estudos de expressão com mutantes carregando uma deleção de um dos domínios, ou ambos, apresentaram atividade catalítica normal em α MM. Porém atividades reduzidas em hidrolases lisossômicas são observadas, e essa redução é dependente da enzima em questão e do domínio excluído. Como a função da subunidade γ tem sido descrita como moduladora da capacidade de fosforilação da GlcNAc-fosfotransferase, o fato dos domínios *Notch-repeat-like 1* e *2*, DMAP e *GNPTG binding* se encontrarem na mesma região suporta essa hipótese (van Meel et al. 2016).

A subunidade β madura é uma proteína de membrana tipo I que possui os domínios transmembrana, citoplasmático e luminal contendo 23, 21 e 284 aminoácidos, respectivamente. Análises funcionais dos mutantes p.Asp1018Gly e p.Lys1001Pro apresentaram grande retenção das proteínas no RE e consequente atividade enzimática nula e residual, respectivamente. Já as análises para os mutantes p.Leu1054Val, p.Lys1236Met, p.Thr1223* e p.Arg986Cys demonstraram proteínas localizadas no complexo de Golgi, que formavam subunidade β e apresentavam atividades enzimáticas residuais, com exceção do último que evidenciou atividade enzimática nula (De Pace et al. 2014; Qian et al. 2014; Velho et al. 2015).

A subunidade γ madura é uma proteína de 36 kDa que apresenta 305 aminoácidos. É altamente conservada ao longo de várias espécies. Análises identificaram os domínios de homologia ao receptor de M6P (HR-M6P) e DMAP. (Fomby & Cherlin 2011; Kudo et al. 2005; van Meel et al. 2016; Munro 2001; Raas-Rothschild et al. 2000; Tiede et al. 2005).

Análises funcionais dos mutantes do domínio de HR-M6P demonstraram que o mesmo apresenta diminuição na fosforilação de diferentes hidrolases lisossômicas. Interessante notar que esses mutantes tem a capacidade de associação às subunidades α/β , conseguem sair do RE e estão localizados no complexo de Golgi. Isso implica que é nesse domínio que ocorre a ligação entre os oligossacarídeos das hidrolases lisossomais, que é a função central atribuída à subunidade γ (van Meel et al. 2016).

Similaridades de sequências de proteína identificaram uma região de muita semelhança entre a sequência proteica do domínio DMAP da subunidade α e a da subunidade γ , e que apresenta significativa conservação ao longo de várias espécies. Há a hipótese desse domínio também ter contribuições para a modulação da fosforilação de hidrolases ácidas, função atribuída à subunidade γ (van Meel et al. 2016).

2.3.3 - Genética

As ML II e III podem ser causadas por alterações patogênicas em dois genes diferentes. O gene *GNPTAB* está localizado no cromossomo 12, na posição 23.2 do braço longo (q) e compreende 21 éxons. Sua transcrição origina o precursor das subunidades α/β e alterações patogênicas neste gene podem resultar nas doenças ML II

e ML III alfa/beta. O gene *GNPTG* está localizado no cromossomo 16 na posição 13.3 do braço curto (p) e compreende 11 éxons, sua transcrição origina a subunidade γ e alterações patogênicas neste gene causam apenas a doença ML III gama (Raas-Rothschild et al., 2000; Tiede et al., 2005).

Até o presente momento, 144 alterações patogênicas já foram descritas no gene *GNPTAB* e 29 alterações patogênicas em *GNPTG* (Stenson et al., 2014). As frequências dos diferentes tipos de alteração (Tabela 2) já publicadas mostram que alterações do tipo troca de sentido e pequenas deleções são os defeitos genéticos no gene *GNPTAB* mais frequentes nos pacientes, 26% e 25% respectivamente. O mesmo padrão de frequências pode ser observado para o gene *GNPTG*.

No Brasil, o trabalho de Cury et al. (2013) relata os primeiros achados moleculares para as ML no país. Em análise do gene *GNPTAB* em 12 pacientes os autores identificaram nove alterações patogênicas diferentes, sendo 4 do tipo troca de sentido (44%), 2 do tipo pequenas deleções (22,2%), 2 do tipo sem sentido (22%) e 1 do tipo alteração de *splicing* (11,1%). Duas alterações patogênicas foram descritas pela primeira vez. Para o gene *GNPTG*, recentemente o trabalho de Velho et al. (2016) relata a alteração patogênica c.328G>T (p.Glu110*), em homozigose, em dois irmãos brasileiros.

Tabela 2 – Frequência das alterações patogênicas encontradas nas Mucopolidoses II e III.

Tipo de Alteração patogênica	Número de Alterações patogênicas	
	Frequências	
	<i>GNPTAB</i>	<i>GNPTG</i>
Troca de sentido	38 (26,38%)	5 (17,24%)
Sem sentido	22 (15,27%)	3 (10,34%)
<i>Splicing</i>	15 (10,41%)	6 (20,68%)
Pequenas Deleções	36 (25%)	7 (24,13%)
Pequenas Inserções	27 (18,75%)	6 (20,68%)
Grandes Deleções	1 (0,69%)	2 (6,89%)
Grandes Inserções	2 (1,38%)	-
Pequenas Indels	3 (2,08%)	-
TOTAL	144	29

Fonte: Stenson et al. 2014

A maioria das alterações patogênicas encontradas nas ML é de rara ocorrência, porém a deleção c.3503_3504delTC localizada no éxon 19 de *GNPTAB* é mundialmente a mais encontrada nos pacientes com ML II e/ou ML III alfa/beta. No Brasil, a frequência deste alelo é de 57,8% (n=11/19 alelos) (Cury et al., 2013), frequência um pouco superior ao encontrado por Cathey et al. (2010) em 22.1% (n=27/122 alelos), Encarnação et al. (2009) em 33,3% dos alelos (n=8/24 alelos), Kudo et al. (2006) em 34,3% dos alelos (n=11/32 alelos) e semelhante ao encontrado por Bargal et al. (2006) que identificou em 50% dos alelos (n=14/28 alelos) e Tappino et al. (2009) em 49,3% (n=40/81 alelos). Esta alteração patogênica parece ter sido originada em apenas um evento que pode ter ocorrido na população Mediterrânea da Europa (Coutinho et al., 2011).

2.3.4 - Relação Genótipo – Fenótipo

Dentre as 144 alterações patogênicas já descritas nas ML II e III alfa/beta em várias populações mundiais, pesquisadores têm procurado realizar as associações entre determinado tipo de alteração, e a consequente atividade enzimática residual do mutante, com o fenótipo correspondente.

Enquanto que a bem documentada relação entre alterações patogênicas dos tipos mudança de fase de leitura e sem sentido com fenótipos MLII é clara (Bargal et al., 2006; Cathey et al., 2010; Cury et al., 2013; Encarnação et al., 2009; Kudo, Brem, & Canfield 2006; Otomo et al., 2009; Tappino et al., 2009), alterações patogênicas do tipo troca de sentido parecem se apresentar como o desafio para compreender como a troca de aminoácidos em um resíduo proteico afeta, ou não, severamente a funcionalidade da GlcNAc-fosfotransferase.

Cathey et al., (2010) em estudo com 61 pacientes com ML encontrou clara correlação entre os pacientes com o fenótipo grave (MLII) e genótipos que são homocigotos ou heterocigotos para dois alelos que são esperados a não produzir, ou produzir muito pouco, produto gênico. Esses alelos, conhecidos como alelos nulos ou amórficos, estão associados a atividades enzimáticas residuais nulas, ou muito baixas, e consequentemente a pacientes que apresentam os fenótipos mais graves. Do total de pacientes descrito pelos autores com MLII, 84% (n=27/32) apresentam genótipos

combinados de alelos nulos. A mesma associação se encontra em: 77% (n=17/22) (Bargal et al. 2006), 75% (n= 4/5) (Cury et al., 2013), 100% (n= 8/8) (Encarnação et al., 2009), 89% (n= 17/19) (Otomo et al., 2009) e 92% (n= 36/39) (Tappino et al., 2009).

Por outro lado, genótipos homozigotos para alterações patogênicas do tipo troca de sentido e de mudança de *splicing*, ou genótipos combinados com pelo menos uma dessas alterações, são esperados a produzir quantidades variáveis de produto gênico e, conseqüentemente, de atividade enzimática residual. Esses alelos são conhecidos como hipomórficos. No trabalho de Cathey et al. (2010), 32 pacientes foram diagnosticados clinicamente como MLIII alfa/beta, e todos eles apresentam pelo menos um alelo hipomórfico, uma alteração patogênica de troca de sentido ou de mudança de *splicing*. O mesmo padrão se mantém em outras populações de pacientes: 100% (n=3/3) (Bargal et al., 2006), 100% (n=3/3) (Cury et al., 2013), 100% (n=2/2) (Encarnação et al., 2009), 100% (n=10/10) (Otomo et al., 2009) e 100% (n=2/2) (Tappino et al., 2009).

Entretanto, até o presente momento já foram descritas 14 alterações patogênicas do tipo troca de sentido em pacientes com MLII (Stenson et al., 2014). Entre as maneiras com que uma alteração do tipo de troca de sentido pode afetar a funcionalidade de uma proteína, pode-se citar defeitos em processos pré-traducionais, como alterar o *splicing*, estabilidade do mRNA, a regulação da transcrição e taxas de tradução, ou em processos pós-traducionais como adicionar ou deletar sítios de fosforilação e clivagem, e alterar sinais de localização intracelular. Além disso, a alteração pode ocorrer em resíduos com função em interações cruciais como sítio catalítico, de associação a proteínas parceiras ou em resíduos que afetam as propriedades estruturais causando dobramento anormal e instabilidade (Thusberg & Vihinen 2009).

2.3.5 - Epidemiologia

A incidência das ML varia entre os diferentes países para os quais existem dados disponíveis. No Japão a incidência foi de 1 recém nascido vivo para 252.500 nascimentos de neonatos normais, em Portugal de 1:123.500, 1:325.000 na Austrália e na Holanda de 1:625.500 (Meikle 1999; Okada et al., 1985; Pinto et al., 2004; Poorthuis et al., 1999). Na região de Quebec, no Canadá, estima-se 1:6.184 recém-nascidos vivos

e que a frequência de heterozigotos seja 1:39 (Plante et al., 2008). Inexistem dados disponíveis para cada tipo de ML especificamente, nem sobre as ML no Brasil.

2.3.6 - Diagnóstico

O diagnóstico inicial realizado nos pacientes com ML é o clínico, através da suspeita clínica, com subsequente confirmação através de outras metodologias. A primeira delas é a medida da atividade de algumas hidrolases lisossômicas no plasma, uma vez que as células de pacientes apresentam o defeito em adicionar o marcador M6P nestas enzimas e conseqüentemente enviá-las ao lisossomo, estas acabam sendo extravasadas ao meio extracelular. Normalmente, um aumento de 5 a 25 vezes da atividade de algumas hidrolases quando comparado com controles confirma o diagnóstico bioquímico (Braulke, Raas-Rothschild, & Kornfeld 2015). O diagnóstico bioquímico, e o molecular, também podem ser realizados em papel filtro (*Dried Blood Spots* – DBS), técnica que possui uma vantagem em função da sua facilidade em coletar a amostra e seu devido armazenamento, mas é necessário um segundo teste confirmatório para o diagnóstico. A medida da atividade da GlcNAc-fosfotransferase em substratos sintéticos também pode ser realizada, mas esse teste é complexo e disponível em apenas alguns centros de referência em poucos países. (Braulke, Raas-Rothschild, & Kornfeld 2015; Cobos et al., 2013).

O sequenciamento através da técnica de Sanger dos dois genes envolvidos na doença é capaz de identificar as duas alterações patogênicas e definir o diagnóstico molecular em 95% dos pacientes (Braulke, Raas-Rothschild, & Kornfeld 2015).

O diagnóstico pré-natal pode ser realizado através da identificação dos pais como heterozigotos portadores, mas essa possibilidade não pode ser inferida através da avaliação da atividade de hidrolases lisossômicas no plasma. O diagnóstico pode ser realizado através da avaliação genética dos pais, em amostras biológicas normais, e do feto através de extração de DNA de células fetais de amniocentese ou biópsia de vilos coriais ou ainda a medição da atividade enzimática de hidrolases lisossômicas em líquido amniótico (Braulke, Raas-Rothschild, & Kornfeld 2015).

2.3.7 - Tratamento

Inexiste tratamento específico disponível, testado e que sua eficiência tenha sido amplamente comprovada. O transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) foi a estratégia terapêutica mais utilizada, o primeiro caso descrito é de uma paciente que foi diagnosticada com ML II aos quatro meses de idade e recebeu a intervenção terapêutica aos oito meses. Após três meses do tratamento a paciente apresentava níveis normais de algumas enzimas lisossômicas e evidência clínica de que o TCTH havia alterado a evolução da doença (Kurobane et al., 1986).

No entanto, em recente revisão da literatura de Lund et al. (2014), os autores descrevem as experiências internacionais no TCTH para 22 pacientes com ML entre os anos de 1991 e 2011. O tempo médio de sobrevida foi de 27.6 meses e no último *follow-up* a taxa de sobrevivência era de apenas 27%, sugerindo que os pacientes continuam apresentando o desfecho “óbito” por complicações relacionadas à doença. Inexistem evidências de melhora no desenvolvimento neurológico e, mesmo após alguns anos ao transplante, a diminuição dos níveis enzimáticos de várias enzimas lisossômicas no plasma se mostrou pequena e insuficiente para a melhora dos sintomas característicos da doença.

Em recente relato de caso, Shibazaki et al. (2016) descrevem dados de um paciente com ML II que recebeu TCTH aos 26 meses de idade. Os autores relatam diminuição de 20-40% da atividade de várias enzimas lisossomais no plasma em seis meses pós-transplante, mas que ainda assim continuavam elevadas de 2 a 10 vezes quando comparadas aos controles. A conclusão dos autores é que a quantidade de enzimas produzidas pelas células normais, decorrentes do transplante, não são suficientes para corrigir os níveis enzimáticos no plasma e conseqüentemente possibilitar mudanças com benefício terapêutico no desenvolvimento e história natural da doença.

Sendo assim, Lund et al. (2014) conclui em sua revisão que existem poucas, ou nenhuma, evidências que comprovem a melhora dos pacientes após o transplante, e que terapias complementares como a Terapia Gênica, Terapia de Reposição Enzimática (TRE) ou Terapia de Redução de Substrato (TRS) são necessárias para atingir um possível tratamento para esses pacientes.

A suplementação *in vitro* com enzimas totais de células normais foi capaz de recuperar alguns aspectos fisiopatológicos observados nas células de pacientes com ML. Há o desaparecimento dos corpos de inclusão do citoplasma, o reestabelecimento da função normal das mitocôndrias, do status da autofagia e aumento da atividade de várias hidrolases lisossômicas, com eficiência enzima específica. Evidenciou-se que a internalização é dose dependente de receptores de M6P, demonstrando que as células afetadas são capazes de internalizar enzimas lisossômicas que possuem marcadores M6P e direcioná-las aos lisossomos (Otomo et al. 2009, 2011).

Seguindo esta linha de pensamento, ainda não há trabalhos publicados sobre TRE para as ML II e ML III. A TRE para a GlcNAc-fosfotransferase dificilmente será possível, uma vez que a enzima não é solúvel e consequentemente capaz de sofrer internalização através de receptores de M6P na superfície da célula. Estratégia semelhante seria realizar TRE para as enzimas lisossômicas recombinantes já disponíveis no mercado, mas cabe ressaltar o alto custo dessa abordagem que a torna inviável do ponto de vista financeiro (Braulke, Raas-Rothschild, & Kornfeld 2015).

A TRS para as ML II e III foi demonstrada por Otomo et al. (2011), onde os autores trataram fibroblastos de pacientes com ML II e reduziram as concentrações celulares de Heparan Sulfato através da administração da droga Genisteína, uma isoflavona extraída da soja que reduz a síntese de Glicosaminoglicanos. Apesar dos resultados positivos, ainda não foram realizados ensaios clínicos.

Ko et al. (2016) produziram um modelo animal de ML II através da deleção dos éxons 12 a 20 de *GNPTAB*. Após evidenciar que o modelo animal apresentava características fenotípicas e fisiopatológicas típicas dos pacientes com ML II, os autores realizaram uma única injeção intravenosa de 3×10^{11} drps (DNase resistance particles) de AAV2/8-*GNPTAB* ou *phosphate-buffered saline* (PBS) em camundongos de seis meses de idade. Não houve diferenças entre o ganho de peso entre controles e animais tratados, nem diferenças estatisticamente significativas nas taxas de crescimento corporal. Porém houve aumento na densidade mineral e massa óssea, demonstrando que o tratamento inibiu o desenvolvimento do fenótipo massa óssea baixa. Também se evidenciou a manutenção da massa magra em animais de 32 semanas pós-tratamento. Os autores concluem que a transferência gênica do AAV2/8-*GNPTAB* em modelos animais de MLII foi efetiva em retardar a perda óssea e de massa magra e reduzir a patologia óssea, e que a expressão do mRNA selvagem de *GNPTAB* permaneceu em níveis elevados em

animais com 32 semanas pós-tratamento. Esse trabalho é a primeira demonstração de intervenção através da terapia gênica para as ML.

Sendo assim, até o presente momento se realiza o aconselhamento genético e a intervenção adotada é paliativa, com a administração de drogas com o objetivo de tratar sintomas e evitar a progressão da doença em alguns aspectos (Braulke, Raas-Rothschild, & Kornfeld 2015).

2.3.8 - Modelos Animais

Modelos animais *knockout* para os genes *GNPTAB* e *GNPTG* são úteis porque a partir deles é possível evidenciar eventos fisiopatológicos importantes para a doença, que são impossíveis ou de difícil análise em material biológico humano, e realizar testes para possíveis estratégias terapêuticas.

Nesse sentido, até o presente momento já foram gerados diversos modelos animais para as ML II e III, entre eles estão camundongos, ratos e peixes Zebrafish. É importante salientar que os modelos animais compartilham diversas características patológicas observadas nos pacientes com ML II e III, mas também são observadas algumas diferenças, e estas devem ser espécie específica ou não observadas em seres humanos em função do curto período de vida dos pacientes, principalmente aqueles acometidos pela forma mais grave da doença (Gelfman et al., 2007).

O primeiro estudo a caracterizar os achados fenotípicos em modelos zebrafish de ML II e III, de Flanagan-Steet et. al. (2009), evidenciaram que as primeiras diferenças entre os animais *knockout* e selvagens surgem já nas primeiras 48 horas pós-fertilização. Ao terceiro dia pós-fertilização, animais *knockout* já apresentavam edema cardíaco significativo, vesículas óticas anormais e eram significativamente menores que animais selvagens. Ao quinto dia pós-fertilização, problemas nas cartilagens, como forma e ângulo, eram evidentes.

Estudos do desenvolvimento embrionário de modelos de zebrafish de ML II e III evidenciaram um importante papel para a excessiva atividade de catepsinas K em estágios onde normalmente essas proteases não são ativas, que acarretam em lesões observadas no tecido cartilaginoso nas ML II e III. Sua inibição corrigiu o fenótipo,

bem como levou a supressão de outras proteases, demonstrando a possibilidade terapêutica sobre essa catepsina. Há também um aumento global na expressão de genes relacionados a proteases, e isso possivelmente deve-se ao acúmulo de materiais nos lisossomos e a conseqüente necessidade do aumento da biogênese lisossomal (Petrey et al., 2012).

Ainda sobre catepsinas, os linfócitos B de camundongos de ML II apresentaram uma redução significativa, mais de 90%, na atividade das catepsinas B e L. Os autores também observaram uma perda total da imunorreatividade para as catepsinas Z e S. Já para os linfócitos T, houve atividade residual (em torno de 20%) para as catepsinas B e L e foi possível detectar as atividades das catepsinas Z e S (Otomo et al., 2015).

A presença de corpos densos nas células de pacientes também é observada em modelos de camundongos de ML II. Análises de imagem e histoquímica em neurônios das regiões do cortical, hipocampo e cerebelo confirmaram o acúmulo significativo e progressivo de gangliosídeos, glicogênios, glicanos, colesterol e estruturas ricas em manose, e que esses agregados estavam colocalizados com marcadores de lisossomo. Uma significativa redução no tamanho do cerebelo e perda de células de Purkinje, em conjunto com a perda de neurônios e atrofia do cérebro são achados indicativos de neurodegeneração progressiva (Kollmann et al., 2012).

Os lisossomos também são maiores em células de camundongos *knockout*, 500nm-2µm, do que em controles, 300-600nm. A função de degradação dos lisossomos está prejudicada e há diminuição no número de lisossomos (0.1 ± 0.1 versus 2.7 ± 0.5) (Boonen et al., 2011).

Estudos em camundongos encontraram o mesmo padrão de disfunção na autofagia encontrada em células de pacientes de ML II e III. As proteínas LC3-II e p62 estão aumentadas em 2,5 e 1,8 vezes, respectivamente, demonstrando um acúmulo de autolisossomos em neurônios. Não foram encontradas diferenças em relação à Beclin-1 e no número de autofagossomas (Boonen et al., 2011; Kollmann et al., 2012).

A fisiopatologia do acometimento ósseo observado nos pacientes também foi estudada em modelos animais. Encontrou-se um aumento significativo na porosidade cortical, indicando o aumento da reabsorção óssea, e uma redução geral nas superfícies ósseas, e nas distâncias entre estas, indicando uma baixa quantidade na formação óssea. Atividade prejudicada dos osteoblastos e contagem anormal dos osteoclastos também

são evidenciadas. Todos esses resultados juntos indicam que a osteoclastogênese está prejudicada e a taxa de reabsorção óssea por área é mais de duas vezes aumentada em ratos MLII (Kollmann et al., 2013).

Outra característica observada é o aumento da expressão de IL-6, reconhecida como interleucina pró-inflamatória e indutora da osteoclastogênese, em osteoblastos (cinco vezes) e condrócitos de camundongos de ML II. Embora osteoblastos sejam considerados os principais reguladores desse processo, existem evidências que outros tipos celulares também podem modular essa via. Foi evidenciado que a expressão de IL-6 é aumentada em ossos longos de modelos animais quando comparada a controles, mais especificamente em condrócitos articulares. O tratamento com transferência gênica de transcrito selvagem de *GNPTAB* diminuiu a produção e secreção de IL-6 e apresentou a melhora do sistema ósseo. Como o sistema ósseo é fortemente afetado nos pacientes com ML, a produção aumentada dessa citocina pelos condrócitos parece contribuir para o fenótipo (Ko et al., 2016; Kollmann et al., 2013).

3 - Justificativa

O estudo presente nessa dissertação faz parte de uma ampla pesquisa em andamento, coordenada pela Profa. Dr. Ida D. V. Schwartz, e que tem como objetivo principal produzir novas informações úteis para o entendimento para as ML II e ML III alfa/beta.

Essas duas doenças, causadas por defeitos genéticos no mesmo gene (*GNPTAB*), apresentam defeito enzimático no processo de síntese dos marcadores de M6P, rota de extrema importância para a fisiologia normal das células. Consequentemente, as hidrolases lisossômicas não adentram nos compartimentos lisossomais e acaba ocorrendo o acúmulo de seus substratos. Os pacientes podem apresentar sintomas já ao nascimento e vir a óbito ainda na primeira década de vida, na forma mais grave da doença. Inexistem dados sobre a prevalência das doenças no Brasil, mas estimativas mundiais apontam para 1 afetado a cada 200.000 nascidos vivos, em média. Sendo o único grupo de pesquisa a atuar no diagnóstico e pesquisas com a doença no país, acreditamos que existem muitos casos subdiagnosticados pela falta de acesso a informação e desconhecimento sobre a doença dos profissionais de saúde.

Essas doenças implicam em morbimortalidade aos pacientes e obrigam aos familiares dispor em tempo e energia para cuidados por tempo integral, além de repetidos internamentos hospitalares, o que acarreta em regime de sofrimento e gastos. Ao estado cabe o suporte paliativo, visto que inexistente tratamento específico para as doenças, o que também acarreta em gastos de recursos financeiros.

Por apresentar características fisiopatológicas únicas, estudos com células de pacientes de ML levaram a elucidação da rota de síntese dos marcadores de M6P e de sua importância para a Rede Lisossômica. Conhecimentos que são ensinados aos graduandos das mais diversas áreas das ciências na saúde. Porém, mesmo as últimas décadas de esforços em estudar a doença não foram capazes de caracterizar totalmente a proteína selvagem da GlcNAc-fosfotransferase, o que acarreta em entendimento incompleto sobre como uma alteração em certa região afeta a função proteica.

4 - Objetivos

4.1 Objetivo Principal

- Caracterizar as alterações patogênicas em pacientes brasileiros com Mucopolioses II e III alfa/beta através do sequenciamento de Sanger do gene *GNPTAB*.

4.2 Objetivos Secundários

- Em um grupo de pacientes brasileiros com ML II e III alfa/beta, identificar as alterações patogênicas causadoras da doença;

- Caracterizar através de estudos funcionais as alterações patogênicas do tipo troca de sentido que ainda não tenham sido descritas, e a alteração mais frequentemente encontrada na população brasileira c.3503_3504delTC;

- Relacionar os achados moleculares com o fenótipo do paciente, a fim de evidenciar a relação genótipo-fenótipo das doenças;

- Definir um protocolo de pesquisa de alterações patogênicas baseado na análise retrospectiva dos dados moleculares de pacientes brasileiros com ML II e III alfa/beta, com o intuito de diminuir custos e o tempo de diagnóstico;

- Comparar em termos de custo os protocolos de pesquisa de alterações patogênicas através do Sequenciamento de Sanger e plataforma NGS.

5 - Referências

- Argmann, Carmen A, Sander M Houten, Jun Zhu, and Eric E Schadt. 2015. "A Next Generation Multiscale View of Inborn Errors of Metabolism." *Cell Metabolism* 23(1): 13–26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.11.012>.
- Bao, Ming, J Leland Booth, B Jean Elmendorf, and William M Canfield. 1996. "Bovine UDP- N -Acetylglucosamine : Lysosomal-Enzyme N -Acetylglucosamine-1-Phosphotransferase I Purification and Subunit Structure." 271(49): 31437–45.
- Bargal, Ruth et al. 2006. "When Mucopolysaccharidosis III Meets Mucopolysaccharidosis II: GNPTA Gene Mutations in 24 Patients." *Molecular Genetics and Metabolism* 88(4): 359–63.
- Biffi, A. 2015. "Gene Therapy for Lysosomal Storage Disorders: A Good Start." *Human Molecular Genetics*: 1–38.
- Boonen, Marielle et al. 2011. "Vacuolization of Mucopolysaccharidosis Type II Mouse Exocrine Gland Cells Represents Accumulation of Autolysosomes." *Molecular biology of the cell* 22(8): 1135–47. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3078071&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Braulke, Thomas, Annick Raas-Rothschild, and Stuart Kornfeld. 2015. "I - Cell Disease and Pseudo - Hurler Polydystrophy : Disorders of Lysosomal Enzyme Phosphorylation and Localization." In *The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*, , 1–31.
- Cathey, Sara et al. 2010. "Phenotype and Genotype in Mucopolysaccharidoses II and III Alpha/beta: A Study of 61 Proband." 47(1): 38–48.
- Cathey, Sara S. et al. 2008. "Molecular Order in Mucopolysaccharidosis II and III Nomenclature." *American journal of medical genetics. Part A* 143A(18): 2106–12.
- Cobos, Paulina Nieves; et al. 2013. "Dried Blood Spots Allow Targeted Screening to Diagnose Mucopolysaccharidosis and Mucopolysaccharidosis." *JIMD Reports* 4: 113–16.
- Coutinho, M. 2014. "N-Acetylglucosamine-1-Phosphate Transferase, Alpha/Beta and Gamma Subunits (GNPTAB, GNPTG)." In *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*, eds. Naoyuki Taniguchi et al. Tokyo: Springer Japan, 1335–47. <http://link.springer.com/10.1007/978-4-431-54240-7> (September 4, 2014).
- Coutinho, M F et al. 2011. "Origin and Spread of a Common Deletion Causing Mucopolysaccharidosis Type II: Insights from Patterns of Haplotypic Diversity." *Clinical genetics* 80(3): 273–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20880125> (September 4, 2014).
- Coutinho, Maria Francisca, Maria João Prata, and Sandra Alves. 2012. "A Shortcut to the Lysosome: The Mannose-6-Phosphate-Independent Pathway." *Molecular Genetics and Metabolism* 107(3): 257–66.
- Coutinho, MF, and S Alves. 2015. "From Rare to Common and Back Again: 60years of Lysosomal Dysfunction." *Molecular Genetics and Metabolism* 117(2): 53–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2015.08.008>.
- Cury, G K et al. 2013. "Mucopolysaccharidosis II and III Alpha/beta in Brazil: Analysis of the

- GNPTAB Gene.” *Gene* 524(1): 59–64.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23566849> (December 30, 2014).
- DiCioccio, R A, and A L Miller. 1991. “Biosynthesis, Processing, and Secretion of Alpha-L-Fucosidase in Lymphoid Cells from Patients with I-Cell Disease and Pseudo-Hurler Polydystrophy.” *Glycobiology* 1(6): 595–604.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1822239.
- Duve, C. de et al. 1954. “Intracellular Distribution Patterns of Enzymes in Rat-Liver Tissues.” : 604–17.
- Encarnação, M et al. 2009. “Molecular Analysis of the GNPTAB and GNPTG Genes in 13 Patients with Mucopolysaccharidosis Type II or Type III - Identification of Eight Novel Mutations.” *Clinical genetics* 76(1): 76–84.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19659762> (September 4, 2014).
- Flanagan-Steet, Heather, Christina Sias, and Richard Steet. 2009. “Altered Chondrocyte Differentiation and Extracellular Matrix Homeostasis in a Zebrafish Model for Mucopolysaccharidosis II.” *The American journal of pathology* 175(5): 2063–75.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000294401060716X>.
- Fomby, Paula, and Andrew J Cherlin. 2011. “Mannose 6-Phosphate Receptor Homology (MRH) Domain-Containing Lectins in the Secretory Pathway Alicia.” 72(2): 181–204.
- Franke, Mine, Thomas Braulke, and Stephan Storch. 2013. “Transport of the GlcNAc-1-Phosphotransferase A/β-Subunit Precursor Protein to the Golgi Apparatus Requires a Combinatorial Sorting Motif.” *Journal of Biological Chemistry* 288(2): 1238–49.
- Gelfman, Claire M et al. 2007. “Mice Lacking Alpha/beta Subunits of GlcNAc-1-Phosphotransferase Exhibit Growth Retardation, Retinal Degeneration, and Secretory Cell Lesions.” *Investigative ophthalmology & visual science* 48(11): 5221–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17962477> (December 30, 2014).
- Greene, A A et al. 1985. “Lysosomal Cystine Storage in Cystinosis and Mucopolysaccharidosis Type II.” *Pediatric research* 19(11): 1170–74.
- Hu, Yong-Bo, Eric B Dammer, Ru-Jing Ren, and Gang Wang. 2015. “The Endosomal-Lysosomal System: From Acidification and Cargo Sorting to Neurodegeneration.” *Translational Neurodegeneration* 4(1): 18.
<http://www.translationalneurodegeneration.com/content/4/1/18>.
- Kawashima, Ikuo et al. 2007. “Cytochemical Analysis of Storage Materials in Cultured Skin Fibroblasts from Patients with I-Cell Disease.” *Clinica Chimica Acta* 378(1-2): 142–46.
- Ko, Ah-Ra et al. 2016. “AAV8-Mediated Expression of N-Acetylglucosamine-1-Phosphate Transferase Attenuates Bone Loss in a Mouse Model of Mucopolysaccharidosis II.” *Molecular Genetics and Metabolism*: 2–10.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096719216300130>.
- Kollmann, K et al. 2012. “Lysosomal Dysfunction Causes Neurodegeneration in Mucopolysaccharidosis II ‘Knock-In’ Mice.” *Brain : a journal of neurology* 135(Pt 9): 2661–75.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3437033&tool=pmcent>

- rez&rendertype=abstract (September 4, 2014).
- Kollmann, Katrin et al. 2013. "Decreased Bone Formation and Increased Osteoclastogenesis Cause Bone Loss in Mucopolidosis II." *EMBO molecular medicine* 5(12): 1871–86.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3914524&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (December 30, 2014).
- Kornfeld, S., and L Reitman. 1981. "Lysosomal Enzyme Targeting N-Acetylglucosaminyl Phosphotransferase Selectively Phosphorylates Native Lysosomal Enzymes." *Biochemical Society transactions* 18: 367–74.
- Kudo, Mariko et al. 2005. "The Alpha- and Beta-Subunits of the Human UDP-N-Acetylglucosamine:lysosomal Enzyme N-Acetylglucosamine-1-Phosphotransferase [Corrected] Are Encoded by a Single cDNA." *The Journal of biological chemistry* 280(43): 36141–49.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16120602> (September 4, 2014).
- Kudo, Mariko, Michael S Brem, and William M Canfield. 2006. "Mucopolidosis II (I-Cell Disease) and Mucopolidosis IIIA (Classical Pseudo-Hurler Polydystrophy) Are Caused by Mutations in the GlcNAc-Phosphotransferase Alpha / Beta - Subunits Precursor Gene." *American journal of human genetics* 78(3): 451–63.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1380288&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kurobane, Ikuo et al. 1986. "Biochemical Treatment Transplantation Improvement by Bone Marrow in I-Cell after Disease." : 63–68.
- Lund, Troy C et al. 2014. "Outcomes after Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Children with I-Cell Disease." *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 20(11): 1847–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25016194>.
- Luzio, J Paul, Yvonne Hackmann, Nele M G Dieckmann, and Gillian M Griffiths. 2014. "The Biogenesis of Lysosomes and Lysosome-Related Organelles." : 1–17.
- Markmann, Sandra et al. 2015. "Lrp1/LDL Receptor Play Critical Roles in Mannose 6-Phosphate-Independent Lysosomal Enzyme Targeting." *Traffic*: 743–59.
- van Meel, Eline et al. 2016. "Multiple Domains of GlcNAc-1-Phosphotransferase Mediate Recognition of Lysosomal Enzymes." *Journal of Biological Chemistry*: jbc.M116.714568. <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M116.714568>.
- van Meel, Eline, Yi Qian, and Stuart a Kornfeld. 2014. "Mislocalization of Phosphotransferase as a Cause of Mucopolidosis III A β ." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(9): 3532–37.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3948257&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (September 4, 2014).
- Meikle, Peter J. 1999. "Prevalence of Lysosomal Storage Disorders." *Jama* 281(3): 249.
<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.281.3.249> (December 30, 2014).
- Munro, Sean. 2001. "The MRH Domain Suggests a Shared Ancestry for the Mannose 6-Phosphate Receptors and Other N-Glycan-Recognising Proteins." *Current Biology* 11(13): 499–501.
- Okada, S et al. 1985. "I-Cell Disease: Clinical Studies of 21 Japanese Cases." *Clinical*

- genetics* 28(3): 207–15.
- Otomo, T et al. 2009. “Inhibition of Autophagosome Formation Restores Mitochondrial Function in Mucopolipidosis II and III Skin Fibroblasts.” *Molecular genetics and metabolism* 98(4): 393–99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19656701> (December 30, 2014).
- . 2011. “Lysosomal Storage Causes Cellular Dysfunction in Mucopolipidosis II Skin Fibroblasts.” *The Journal of biological chemistry* 286(40): 35283–90. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3186395&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (December 30, 2014).
- Otomo, T. et al. 2015. “Mannose 6 Phosphorylation of Lysosomal Enzymes Controls B Cell Functions.” *The Journal of Cell Biology* 208(2): 171–80. <http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.201407077>.
- Otomo, Takanobu et al. 2009. “Mucopolipidosis II and III Alpha/beta: Mutation Analysis of 40 Japanese Patients Showed Genotype-Phenotype Correlation.” *Journal of human genetics* 54(3): 145–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19197337> (September 4, 2014).
- Otomo, Takanobu, Mohammad Arif Hossain, Keiichi Ozono, and Norio Sakai. 2012. “Genistein Reduces Heparan Sulfate Accumulation in Human Mucopolipidosis II Skin Fibroblasts.” *Molecular genetics and metabolism* 105(2): 266–69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22088809> (December 30, 2014).
- Owada, Misao, and Elizabeth F. Neufeld. 1982. “Is There a Mechanism for Introducing Acid Hydrolases into Liver Lysosomes That Is Independent of Mannose 6-Phosphate Recognition? Evidence from I-Cell Disease.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 105(3): 814–20.
- De Pace, Raffaella et al. 2014. “Mucopolipidosis II-Related Mutations Inhibit the Exit from the Endoplasmic Reticulum and Proteolytic Cleavage of GlcNAc-1-Phosphotransferase Precursor Protein (GNPTAB).” *Human mutation* 35(3): 368–76. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24375680> (September 4, 2014).
- . 2015. “Subunit Interactions of the Disease-Related Hexameric GlcNAc-1-Phosphotransferase Complex.” *Human molecular genetics* 24(23): ddv387 – . <http://hmg.oxfordjournals.org/content/early/2015/09/30/hmg.ddv387.long> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26385638>.
- Petrey, a. C. et al. 2012. “Excessive Activity of Cathepsin K Is Associated with Cartilage Defects in a Zebrafish Model of Mucopolipidosis II.” *Disease Models & Mechanisms* 5(2): 177–90.
- Pinto, Rui et al. 2004. “Prevalence of Lysosomal Storage Diseases in Portugal.” *European journal of human genetics : EJHG* 12(2): 87–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14685153>.
- Plante, M et al. 2008. “Mucopolipidosis II: A Single Causal Mutation in the N-Acetylglucosamine-1-Phosphotransferase Gene (GNPTAB) in a French Canadian Founder Population.” *Clinical genetics* 73(3): 236–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18190596> (December 30, 2014).
- Poorthuis, B. J H M et al. 1999. “The Frequency of Lysosomal Storage Diseases in The Netherlands.” *Human Genetics* 105(1-2): 151–56.
- Qian, Yi et al. 2013. “The DMAP Interaction Domain of UDP-GlcNAc:lysosomal

- Enzyme N-Acetylglucosamine-1-Phosphotransferase Is a Substrate Recognition Module.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(25): 10246–51.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3690890&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (September 4, 2014).
- . 2014. “Analysis of Mucopolipidosis II/III Missense Mutations Identifies Domains of UDP-GlcNAc:lysosomal Enzyme GlcNAc-1-Phosphotransferase Involved in Catalytic Function and Lysosomal Enzyme Recognition.” *Journal of Biological Chemistry* 290: 3045–56.
<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M114.612507>.
- Raas-Rothschild et al. 2000. “Molecular Basis of Variant Pseudo-Hurler Polydystrophy (Mucopolipidosis IIIC).” *The Journal of clinical investigation* 105(5): 673–81.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=289169&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Reczek, David et al. 2007. “LIMP-2 Is a Receptor for Lysosomal Mannose-6-Phosphate-Independent Targeting of ??-Glucocerebrosidase.” *Cell* 131(4): 770–83.
- Rijnboutt, Simon et al. 1991. “Mannose 6-Phosphate-Independent Targeting of Cathepsin D to Lysosomes in HepG2 Cells.” *Journal of Biological Chemistry* 266(35): 23586–92.
- Sabatini, David D, and Milton B Adesnik. 2015. “The Biogenesis of Membranes and Organelles The Organization of the Eukaryotic Cell.” In *The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*, , 1–132.
- Sadegh-Nasseri, Scheherazade, and AeRyon Kim. 2015. “Exogenous Antigens Bind MHC Class II First, and Are Processed by Cathepsins Later.” *Molecular immunology* 68(2): 81–84.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589015300262>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26254987>.
- Shibazaki, Takumi et al. 2016. “Clinical and Laboratory Outcomes after Umbilical Cord Blood Transplantation in a Patient with Mucopolipidosis II Alpha/beta.” *American Journal of Medical Genetics Part A (M1)*: n/a – n/a.
<http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.a.37563>.
- Spranger, J. W., and H.-R. Wiedemann. 1970. “The Genetic Mucopolipidoses.” *Human Genetics* 9(2): 113–39. <http://link.springer.com/10.1007/BF00278928>.
- Stenson, Peter D et al. 2014. “The Human Gene Mutation Database: Building a Comprehensive Mutation Repository for Clinical and Molecular Genetics, Diagnostic Testing and Personalized Genomic Medicine.” *Human genetics* 133(1): 1–9.
- Tappino, Barbara et al. 2009. “Molecular Characterization of 22 Novel UDP-N-Acetylglucosamine-1-Phosphate Transferase - α and β -Subunit (GNPTAB) Gene Mutations Causing Mucopolipidosis Types II α/β and III α/β in 46 Patients.” *Human Mutation* 30(11): 956–73.
- Thusberg, Janita, and Mauno Vihinen. 2009. “Pathogenic or Not? And If So, Then How? Studying the Effects of Missense Mutations Using Bioinformatics Methods.” *Human Mutation* 30(5): 703–14.
- Tiede, Stephan, Nicole Muschol, et al. 2005. “Missense Mutations in N-

- Acetylglucosamine-1-Phosphotransferase Alpha/beta Subunit Gene in a Patient with Mucopolysaccharidosis III and a Mild Clinical Phenotype.” *American journal of medical genetics. Part A* 137A(3): 235–40.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16094673> (December 30, 2014).
- Tiede, Stephan, Stephan Storch, et al. 2005. “Mucopolysaccharidosis II Is Caused by Mutations in GNPTA Encoding the Alpha/beta GlcNAc-1-Phosphotransferase.” *Nature medicine* 11(10): 1109–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16200072> (September 4, 2014).
- Tietze, F, and J D Butler. 1979. “Elevated Cystine Levels in Cultured Skin Fibroblasts from Patients with I-Cell Disease.” *Pediatric research* 13(12): 1350–55.
- Tzeng, Yih-ling, Corie Noble, and David S Stephens. 2003. “Genetic Basis for Biosynthesis of the (α 134) -Linked N-Acetyl- D -Glucosamine 1-Phosphate Capsule of Neisseria Meningitidis Serogroup X.” *Society* 71(12): 6712–20.
- Velho, Renata Voltolini et al. 2015. “Analyses of Disease-Related GNPTAB Mutations Define a Novel GlcNAc-1- Phosphotransferase Interaction Domain and an Alternative Site-1 Protease Cleavage Site.” : 1–34.
- . 2016. “Enigmatic in Vivo GlcNAc-1-Phosphotransferase (GNPTG) Transcript Correction to Wild Type in Two Mucopolysaccharidosis III Gamma Siblings Homozygous for Nonsense Mutations.” *Journal of Human Genetics* (January): 1–6.
<http://www.nature.com/doi/10.1038/jhg.2016.13>.
- Wager, Kim, Fahad Mahmood, and Claire Russell. 2014. “Modelling Inborn Errors of Metabolism in Zebrafish.” *Journal of inherited metabolic disease* 37(4): 483–95.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24797558> (September 4, 2014).

6 - Artigos

6.1 - An update on the genotypic spectrum of ML II and III alpha/beta in Brazil: a description of 13 novel cases

An update on the genotypic spectrum of ML II and III alpha/beta in Brazil: a description of 13 novel cases

Ludwig NF^{1,2,4}, Velho RV⁶, Sperb-Ludwig F^{1,2,4}, Acosta A⁷, Ribeiro E⁸, Kim CA⁹, Horovitz DG¹⁰, Boy R¹¹, Rodovalho-Doriqui, M J¹², Lourenço C M¹³, Pohl S⁶, Schwartz, IVD^{2,3,4,5}.

- 1- Center of Genic Therapy - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil
- 2- BRAIN Laboratory - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil
- 3- Post Graduate Program in Genetics and Molecular Biology of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
- 4- Post Graduate Program in Medical Sciences of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
- 5- Medical Genetics Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil
- 6- Department of Biochemistry, Children's Hospital, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany
- 7- Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil
- 8- Association for Genetic Diseases of the State of Ceará, Fortaleza, Brazil
- 9- Genetics Unit, Instituto da Criança, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, Brazil
- 10- Fernandes Figueira National Institute for Women's, Children's and Adolescents' Health, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil
- 11- Department of Mother and Child Health, State Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
- 12- Juvêncio Mattos Children's Hospital, São Luiz, Maranhão, Brazil
- 13- Ribeirão Preto Clinics Hospital, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

Corresponding Author:

Ida Vanessa D. Schwartz, MD, PhD

Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350 – Porto Alegre – RS – Brasil – 90035-003

E-mail: ischwartz@hcpa.edu.br

Tel: +55-51-33598309, Fax: +55-51-33598010

Abstract

Background: Mucopolysaccharidoses (ML) II (MIM #252500) and III alpha/beta (MIM #252600) are lysosomal storage diseases caused by the presence of pathogenic mutations in *GNPTAB* and, consequently, deficient activity of N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase (GlcNAc-1-phosphotransferase). The objective of the present study was to characterize a sample of Brazilian patients with ML II or III alpha/beta.

Methodology: The present was an observational cross-sectional study with a convenience sample. The genomic DNA of 13 patients (ML II = 8; ML III alpha/beta = 5) was analyzed as well as the genomic DNA of a patient's mother with a biochemical and clinical diagnosis of ML II. The exons of the *GNPTAB* gene and its flanking regions were sequenced. Mutations c.3503_3504delTC (p.Leu1168Glnfs*5) and c.1154C>T (p.Ser385Leu) were expressed by site-directed mutagenesis. **Results:** The pathogenic mutations were identified in all individuals analyzed. Alterations c.3503_3504delTC and c.1208T>C (p.Ile403Thr) were the most prevalent; the first alteration was found in 5 patients with ML II (homozygous = 2; compound heterozygous = 3) and in 3 patients with ML III (compound heterozygous = 3); the second alteration was found in 3 patients with ML III (compound heterozygous = 3). The following six novel pathogenic alterations are being described herein: c.277A>G (p.Asp76Gly), p.Ser385Leu, c.831delT, c.1763insA, c.1927delAATT and c.3333T>G (p.Tyr1111*). The mutants p.Ser385Leu and c.3503_3504delTC showed 1.5% and 0% of GlcNAc-1-phosphotransferase, respectively. **Conclusions:** Contrary to c.3503_3504delTC and p.Ser385Leu, mutation p.Ile403Thr seems to be a less severe allele of the *GNPTAB* gene and that is associated to ML III alpha/beta. The data of the present study increase the knowledge on the genotypic spectrum of ML II and ML III alpha/beta as well as on the genotypic-phenotypic relations of these diseases.

Keywords: Mucopolysaccharidoses II/III alpha/beta, GlcNAc-1-phosphotransferase, *GNPTAB*, pathogenic alterations.

1. Introduction

Lysosomes are responsible for the degradation of several types of macromolecules, such as proteins and carbohydrates, and for that over 50 acid hydrolases and 120 lysosomal membrane proteins are used [1]. The correct addressing of these enzymes depends on residues of mannose-6-phosphate (M6P), generated in the Golgi apparatus. These residues are synthesized by the combined action of two enzymes; the first enzyme is N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase (EC 2.7.8.17 - GlcNAc-1-phosphotransferase), which catalyzes the transference of N-acetylglucosamine (GlcNAc)-1-phosphate to the hydroxyl group of carbon 6 of the terminal mannose of newly synthesized lysosomal enzymes. With subsequent action, enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphodiesterase α -N-acetylglucosaminidase (EC 3.1.4.45) removes GlcNAc residues, exposing M6P residues [1].

The enzyme GlcNAc-1-phosphotransferase is a hexameric complex of 540 kDa consisting of two α , two β , and two γ subunits. The two first subunits are codified by the *GNPTAB* gene, located in chromosome 12q23.3, which contains 21 exons. This gene codifies a precursor protein of 1256 amino acids that contains the catalytic portion of the enzyme. The γ subunit is codified by the *GNPTG* gene, located in chromosome 16p13.3, contains 16 exons. It codifies a protein of 305 amino acids, and it seems to modulate the activity of the α/β subunits [2–6].

Pathogenic alterations in *GNPTAB* that cause the total loss of the activity of GlcNAc-1-phosphotransferase originates the recessive autosomal disease called Mucopolidosis II alpha/beta (MLII; MIM #252500). This form of the disease is recognizable at birth, has a severe phenotype and a rapid progressive course, which leads to death in the first decade of life. Patients may present coarse facial features, short and claw hands, gingival hyperplasia, and severe developmental delay. The other form of the disease, ML III alpha/beta (MIM #252600), also occurs due to pathogenic alterations in *GNPTAB*, but its symptoms are less severe than those in ML II; their onset is during childhood, and their progression is slower. In this case, clinical signs may be gradually coarse facial features, mild gingival hyperplasia, and bone problems. ML III gamma (MIM #252605) is caused by pathogenic alterations in *GNTPG*, presents its first clinical signs in adolescence and has a slow progressive course; bone alterations may hinder daily activities, and patients may survive until adulthood [7–10].

Until now, 144 pathogenic alterations in *GNPTAB* that cause ML II/III alpha/beta have already been reported [11]. Besides the quantitative richness of alterations, there is also high qualitative heterogeneity, since missense/nonsense alterations (60), deletions (37), insertions (29), splicing change (15), and insertions/deletions (3) have been observed. The way each of them affects the protein is different, and, therefore, the occurrence of the different types may justify the phenotypic variability of patients. Because of their greater impact on the protein, frameshift and nonsense alterations have been related to ML II, resulting in practically zero enzyme activity. In patients with ML III alpha/beta, missense alterations have been observed, which is expected, since these may be less impacting to the protein, and patients present minimum residual enzyme activity [7,12].

Molecular information coupled with the clinical picture is of great importance not only for a complete diagnosis but also for the understanding of the functionality of each of the GlcNAc-1-phosphotransferase subunits. The objective of the present paper is to describe the pathogenic alterations as well as the findings of the genotype-phenotype association in fourteen Brazilian individuals with ML II or III alpha/beta.

2. Materials and Methods

2.1. Patients

The present was an observational cross-sectional study with a convenience sample. Patients were recruited from contact with medical geneticists countrywide in Brazil, using the e-mail list of the Brazilian Society of Medical Genetics. For study inclusion, patients needed to have: 1) a clinical phenotype compatible with ML II or III; and 2) a confirmed biochemical diagnosis of ML II or III (elevated activity of different lysosomal hydrolases in plasma and/or filter-paper, and reduced in fibroblasts), or a biochemical diagnosis suggestive of ML II or III (elevated activity of different lysosomal hydrolases in plasma and/or filter-paper) (data not shown).

Thirteen unrelated patients were included (ML II = 8; ML III = 5) as well as the mother of a deceased patient with a clinical and biochemical diagnosis of ML II (Patient 3, Table 1). The rate of parental consanguinity was 2/14 (14.2%), totaling 25 alleles to be analyzed. Whenever possible, DNA samples of both parents of the patient were also investigated to confirm findings (Table 1). Two patients already reported in a previous study of the group [8] were included because their diagnosis was concluded during the

present study (Patients 6 and 13, Table 1). For all patients, the assistant physician was asked to complete an information sheet containing data such as origin, presence of consanguinity, and type of ML. The classification of the type of ML was revised for all patients by a physician specialist in the area (IVDS, author of the present paper).

2.2. Molecular Analysis

The genomic DNA (gDNA) of patients was extracted from blood samples collected in a vial containing EDTA with Easy-DNA purification kit (Thermo Fisher). Amplifications of exons of the *GNPTAB* gene were performed from standard reaction using 50 ng of gDNA, 16 pmol of each oligonucleotide, 1mM of dNTPs, 2.4 mM of MgCl₂, 1x of reaction buffer, and 1 unit of Taq DNA polymerase. Primer sequences and their annealing temperatures are shown in Table 1 (supplementary material). PCR products were purified with polyethylene glycol 8000 and 2.5M NaCl, and sequencing was performed using the ABI Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). All samples positive for alterations were amplified and sequenced again with the oligonucleotide contrary to the one used first.

All sequenced samples were analyzed individually by the Chromas and the BLAST (NCBI) programs using as reference sequence NM_024312.4 (*GNPTAB*, GenBank). Mutation nomenclature follows the HSVG rules.

2.3. Frequency of novel missense mutations in controls

Novel missense alterations were investigated in 100 Brazilian healthy controls. The c.227A>G (p.Asp76Gly) was analyzed by sequencing and the c.1154C>T (p.Ser385Leu) using restriction enzyme *HphI* (R0158S, New England Biolabs Inc.); in the presence of the alteration, one of the three sites of the enzyme corresponding to the normal sequence were excluded.

2.4. *In Silico* Analyses

The novel missense alterations were analyzed as to their pathogenicity using the following programs: PolyPhen2 (Polymorphism Phenotyping) [13], SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) [14], and ConSurf [15,16].

2.5. Generation of mutant *GNPTAB* cDNA construct

The pathogenic *GNPTAB* mutation p.Ser385Leu and c.3503_3504delTC (p.Leu1168Glnfs*5) were inserted into the wild-type *GNPTAB* full-length cDNA construct [17] by site-directed mutagenesis using mutagenic primers (for-CTTGCCTACCTTTAGTTTACCTGCTATTGAAAGTC, rev-GACTTTCAATAGCAGGT AACTAAAGGTAGGCAAG and for-CAGACAGTGAAGGCTGTTTCAGGGACTTCTAT G, rev-CATAGAAGTCCCTGAACAGCCTTCACTGTCTG) and Phusion® polymerase (Life Technologies). Mutagenic primers were designed using the web-based program PrimerX (www.bioinformatics.org/primerx). The plasmid DNAs were commercially sequenced to confirm proper introduction of the mutations (SeqLab, Germany).

2.6. GlcNAc-1-phosphotransferase activity assays

HEK cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FCS, GlutaMAX™ and penicillin/streptomycin (Life Technologies) at 37 °C and 5% CO₂. Cells grown on 10-cm plates were transiently transfected with cDNAs coding for human wild-type or mutant (p.Ser385Leu or c.3503_3504delTC) α/β -subunit precursor using JetPEI® reagent (VWR International) according to the manufacturer instructions. Non-transfected cells were used as negative control. For GlcNAc-1-phosphotransferase activity measurements cell extracts were analyzed 24 h after transfection, as recently described [12]. In brief, aliquots of cell extracts (100 μ g protein) were adjusted to 50 mM Tris/HCl (pH 7.4) containing 10 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂, 2 mg/ml BSA, 2 mM ATP, 75 μ M UDP-GlcNAc (Sigma-Aldrich), and incubated with 1 μ Ci UDP-[³H]GlcNAc (American Radiolabeled Chemicals) and 100 mM α -methylmannoside (Sigma-Aldrich) at 37°C for 1 h. After the incubation time, 2 mM Tris/HCl (pH 8.0) was added to the samples and applied to QAE sephadex A-25 column (GE Healthcare) and the columns were washed twice with 2 mM Tris/HCl (pH 8.0). The bound [³H]-GlcNAc-P reaction product was eluted twice with 30 mM NaCl in 2 mM Tris/HCl (pH 8.0). Each elution was collected and measured in scintillation liquid. The values obtained from non-transfected cell lysates were subtracted from the values obtained

from cell lysates transfected with wild-type or the mutant to correct for endogenous enzyme activity and non-specific background counts.

2.7. Ethical Considerations

The present study was approved by the Ethics and Research Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3. Results

The summary of the clinical and biochemical findings of patients included in the study is described in Table 1. All 13 patients had their genotype fully characterized.

As to genotype, 12 pathogenic alterations were found (Fig. 1), from which 6 are novel (p.Asp76Gly, p.Ser385Leu, c.831delT, c.1763insA, c.1927delAATT, and c.3333T>G (p.Tyr1111*)). Variant c.3503_3504delTC was the most frequent (n = 10/25 alleles, 40%), followed by c.1208T>C (p.Ile403Thr) (n= 3/25 alleles, 12%). The variants p.Ser385Leu and p.Asp76Gly were not identified in 100 controls researched.

GlcNAc-1-phosphotransferase activity of mutants p.Ser385Leu and c.3503_3504delTC were, respectively, 1.5 and 0%.

According to the bioinformatics program SIFT, variants p.Asp76Gly and p.Ser385Leu are predicted as deleterious (score 0); PolyPhen2 also suggests that both alterations are deleterious for the function of the protein (score 1). Residue 385 is described as structural by ConSurf, and the residue 76 is described as functional, and both are described as being highly conserved among species.

Table 1 – Pathogenic alterations in *GNPTAB* found in 14 Brazilian patients with Mucopolipidosis II and III alpha/beta

Patients	Phenotype	Sex	Age at Biochemical Diagnosis (months)	Consanguinity	Age at Study Inclusion (months)	Age at Death (months)	Genotype (cDNA) Allele 1/Allele 2	Genotype (protein) Allele 1/ Allele 2	Location (Exon)
1	ML II	M	22	Yes	26	72	c.3503_3504delTC/c.3503_3504delTC	p.Leu1168Glnfs*5/p.Leu1168Glnfs*5	19/19
	Father						c.3503_3504delTC/normal	p.Leu1168Glnfs*5/normal	
	Mother						normal/c.3503_3504delTC	normal/p.Leu1168Glnfs*5	
2	ML II	M	73	No	74	Alive	c.3503_3504delTC/c.3503_3504delTC	p.Leu1168Glnfs*5/p.Leu1168Glnfs*5	19/19
	Father						c.3503_3504delTC/normal	p.Leu1168Glnfs*5/normal	
	Mother						normal/c.3503_3504delTC	normal/p.Leu1168Glnfs*5	
3	ML II	M	9	No	17	17			
	Mother						normal /c.3503_3504delTC	normal/p.Leu1168Glnfs*5	?/19
4	ML II	M	18	No	18	Alive	c.3503_3504delTC/c.2249insA	p.Leu1168Glnfs*5/p.Asn750Lysfs*8	19/13
5	ML II	M	20	No	20	Alive	c.3503_3504delTC/c. 831delT	p.Leu1168Glnfs*5/p. Phe277Phefs*3	19/8
*6	ML II	F	24	No	48	56	c.3503_3504delTC/c. 1154C>T	p.Leu1168Glnfs*5/p. Ser385Leu	19/10
	Mother						c.1154C>T/normal	p.Ser385Leu/normal	
7	ML II	M	16	No	23	Alive	c.1763insA/c.3333T>G	p.His588Glnfs*26/p.Tyr1111*	13/17
8	ML II	M	5	No	5	19	c.242G>T/c. 1927delAATT	p.Trp81Leu/p. Asn642Leufs*10	3/13
	Father						normal/c.1927delAATT	normal/p.Asn642Leufs*10	
	Mother						c.242G>T/normal	p.Trp81Leu/normal	
9	MLII	M	?	Yes	75	Alive	c.277A>G/c.277A>G	p.Asp76Gly/p.Asp76Gly	3/3
10	ML III	M	?	No	174	Alive	c.3503_3504delTC/c.1208T>C	p.Leu1168Glnfs*5/p.Ile403Thr	19/10
	Mother						c.1208T>C/normal	p.Ile403Thr/normal	
11	ML III	F	255	No	255	Alive	c.3503_3504delTC/c.1208T>C	p.Leu1168Glnfs*5/p.Ile403Thr	19/10
12	ML III	M	412	No	412	Alive	c.3503_3504delTC/c.1514G>A	p.Leu1168Glnfs*5/p.Cys505Tyr	19/14
*13	ML III	F	29	No	29	Alive	c.242G>T/c.2249insA	p.Trp81Leu/p.Asn750Lysfs*8	3/13
14	ML III	F	154	No	159	Alive	c.1208T>C/c.832C>T	p.Ile403Thr/p.Gln278*	10/8
	Mother						c.1208C>T/normal	p.Ile403Thr/normal	

*Patient described by Cury et al. (2013) with an identified alteration. Mutations being described for the first time in the present study are presented in bold. For Patient 3, only the maternal alteration is shown (only the mother's DNA was available for analysis).

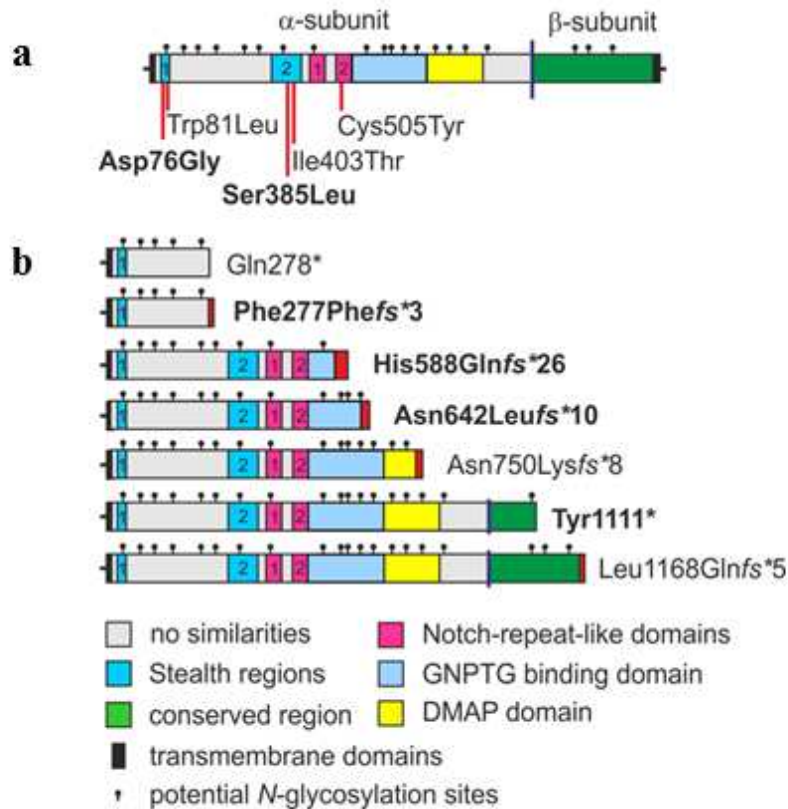


Figure 1. Schematic presentation of the domain organization of the full-length wild-type and mutant α/β -subunit precursor protein of the GlcNAc-1-phosphotransferase. The positions of the five missense mutations are indicated in the upper scheme (a). The C-terminally truncated α/β -subunit precursor mutants are shown below (b). The novel mutations identified in the patients are marked in bold. The positions of potential *N*-glycosylation sites (●) and the site-1 protease cleavage site between amino acid K928 and D929 (in blue) are indicated.

4. Discussion

ML II and III alpha/beta are ultra-rare diseases, different from a phenotypic standpoint, but caused by pathogenic mutations in the same gene, *GNPTAB*. In the present study, it was possible to identify the variants causing these diseases in a cohort of Brazilian patients. Twelve different alterations were found, of which six are novel, which demonstrates and confirms the high heterogeneity of *GNPTAB* [2,7,8,18–20].

Homozygous or heterozygous compound genotypes for frameshift or nonsense alterations are usually related to zero or very low enzyme activity of GlcNAc-1-

phosphotransferase and, therefore, to ML II. On the other hand, alterations that affect the protein in a way that the transcript presents some residual activity, since they are less impacting to the genic product, have been reported in patients with ML III alpha/beta. It is important to highlight that activities of GlcNAc-1-phosphotransferase as low as 2% have been related to milder phenotypes [7,8,12,19–23,17] and that some cases pose a challenge to a clinical prediction based on the molecular diagnosis since certain genotypes not always result in the expected clinical variant.

Alteration c.3503_3504delTC showed the highest frequency in the patients of the present study, similar to the frequency previously described by Cury et al. [8] in Brazil and by other studies conducted in different populations [19,20,22,23]. This mutation was described by Kudo et al. [20] as a null allele, and by immunofluorescence studies conducted by De Pace et al. [17] as an alteration located only in the endoplasmic reticulum (ER); in this study it was shown as having an undetectable enzyme activity, which is in line with the most severe clinical phenotype (ML II) presented by the individuals homozygous for it.

The second most frequent alteration was p.Ile403Thr, found in three patients with ML III alpha/beta in heterozygosis. It was described by Encarnação et al. [19] in one patient with MLIII alpha/beta, with the second alteration unidentified. The variant causes the exchange of an apolar amino acid to a polar one, in the 403 residue of the protein, which is structural and highly conserved among species. Tappino et al. [22] described it in homozygosis in a 13-year-old patient with ML III alpha/beta. Velho et al. [12] and Qian et al. [21] analyzed the alteration, and their results showed that the levels of the β -subunit are undetectable, there is a strong localization in the ER, and the residual activity of the enzyme was between 4 and 11%. The authors concluded that the alteration strongly reduces the transport of the mutant protein to the Golgi apparatus but does not cause the complete blocking of this transport, which agrees with the mild phenotypes presented by patients with ML III alpha/beta.

The *in silico* analysis of the new alteration p.Ser385Leu, present in Patient 6, characterized it as a highly conserved residue, harmful to the protein. This may be explained by the exchange of one neutral polar amino acid to one apolar amino acid; the exchange of amino acids of different charges may affect the structure and conformation of the resulting mutant, which, consequently, may harm the function of the protein [24]. Alteration c.1120T>C (p.Phe374Leu), located 11 amino acids upstream of p.Ser385Leu, was studied by immunofluorescence by Qian et al. [21] and the resulting mutant is transported to the Golgi apparatus, that is to say, it is cleaved and active, but its activity in the enzyme assay is lower

than 2%. These results suggest that the residue may be involved in the catalytic function of the enzyme. On the other hand, the alteration c.1196C>T (p.Ser399Phe), located 14 amino acids downstream from p.Ser385Leu, was also studied by these same authors as well as by De Pace et al. [17], and the results showed a strong localization in the ER, an enzyme activity of $8\pm 2\%$, and little or no beta subunit, showing that few transcript of *GNPTAB* suffers cleavage by S1P and, consequently, a very small portion may be active. The structural alterations p.Leu380Ala and p.Glu382Ala were analyzed by Velho et al. [12], and the results found were stable mutants, located in the Golgi apparatus, and which suffer cleavage by S1P; there does not seem to be a greater involvement of the protein. The analysis of the enzyme activity of mutant p.Ser385Leu showed results compatible with the ML II phenotype presented by our patient, who died at 54 months of age due to respiratory complications, and who, at that time, was able to walk, presented moderate nonverbal communication, and formed sentences with only two words. It should be highlighted that p.Ser385Leu is located in the domain called *Stealth* [25] of the wild-type protein *GNPTAB*. Expression studies with other missense alterations in this domain have results of sub localization, formation of the β -subunit and residual enzyme activity of the highly variable mutants [12,21,17]. As the function of this domain has not been defined yet, the results described herein provide further information that will help determine the function of this domain and its importance for the function of GlcNAc-1-phosphotransferase.

Alteration c.242G>T (p.Trp81Leu) was found in Patients 8 and 13 in compound heterozygosis with frameshift alterations, and who were diagnosed with ML II and ML III alpha/beta, respectively. Described for the first time by Encarnação et al. [19] in a homozygote patient with a diagnosis of ML III alpha/beta with a severe clinical picture, the alteration causes the substitution of apolar amino acids in a position that is highly preserved in several species, which would explain the phenotype observed. Qian et al. [21] showed that the mutant was co-located in the Golgi apparatus and ER and showed an enzyme activity lower than 2%. De Pace et al. [17] found normal levels of mRNA expression, did not detect the β -subunit, and the localization was observed only in ER. These contradictory functional results match the different phenotypes observed in the patients who have this alteration.

The *in silico* analysis of alteration p.Asp76Gly, present in homozygosis in Patient 9, was characterized as deleterious to the protein and not tolerated. The change of one polar acid amino acid for one apolar amino acid in a functional residue, highly preserved among species, may be deleterious to the function of the protein and explain the severe phenotype observed. The only pathogenic alteration that belongs to the same domain and counts with functional

studies is p.Trp81Leu [21,17], but the results of these studies are contradictory, and this alteration was identified in Brazilian patients with ML II and ML III alpha/beta. Functional studies with mutant p.Asp76Gly will be needed to evaluate its residual activity and intracellular localization; however, since the patient described herein has a phenotype compatible with ML II and is a homozygote for this mutation, this mutation seems to be severe.

Alteration c.1514G>A (p.Cys505Tyr) was described by Cathey et al. [7] in a patient with ML III alpha/beta as deleterious to the protein and non-tolerated; however, the functional studies of the protein are contradictory. Qian et al. [21] showed that the mutant was partially retained in the ER, and the levels of the β -subunit were slightly reduced, which corroborates with the reduced enzyme activity ($36\pm 21\%$). On their turn, Velho et al. [12] found that 20% of the mutant protein was cleaved by S1P but with major localization in the ER and enzyme activity of $4\pm 2\%$. Patient 5 was biochemically diagnosed in his adult life and was clinically diagnosed as being ML III alpha/beta only because he presented bone problems that made it difficult for him to carry out simple activities, such as walking and running. Also, this patient did not present neurological complications, which is in line with the data presented by Cathey et al. [7] and Velho et al. [12].

Alteration c.2249insA was found in heterozygosis in Patients 4 and 12, diagnosed as having ML II and ML III alpha/beta, respectively. Described by Encarnação et al. [19], and also in heterozygosis in a patient with ML II, the alteration generates a premature stop codon in amino acid 758. The alteration c.832C>T (p.Gln278*), identified in Patient 13, codifies a truncated protein and is likely to have zero enzyme activity. This alteration is described by Kudo et al. [20] in two heterozygous female siblings diagnosed with ML III alpha/beta; the second alteration identified was the change of splicing c.3335+6T>G.

Alterations c.1763insA and p.Tyr1111*, seen in Patient 7, c.1927delAATT, seen in Patient 8, and c.831delT, seen in Patient 5, originate premature stop codons and truncated proteins of 614, 1111, 652 and 280 amino acids, respectively. Alterations that cause the loss of the reading phase and that lead to premature stop codons and truncated proteins are associated to patients with ML II, as seen in the three patients that carry these alterations [19,20,22,23,17].

5. Conclusions

The allele most frequently associated to ML II/III alpha/beta in Brazil is c.3503_3504delTC. Contrary to c.3503_3504delTC and p.Ser385Leu, mutation p.Ile403Thr seems to be a less severe allele of *GNPTAB* which is associated to ML III. However, for mutation p.Trp81Leu, it was not possible to determine the relation genotype vs clinical phenotype. The data of the present study increase the knowledge about the genotypic spectrum of ML II and ML III alpha/beta as well as about the genotype-phenotype relations of these diseases.

Acknowledgements

The present study was financed by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Brazilian Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES), the Fund for the Incentive of Research of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), and the Deutsche Forschungsgemeinschaft SFB877 to RVV and SP.

REFERENCES

- [1] T. Braulke, J.S. Bonifacino, Sorting of lysosomal proteins., *Biochim. Biophys. Acta.* 1793 (2009) 605–14. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.10.016.
- [2] S. Tiede, S. Storch, T. Lübke, B. Henrissat, R. Bargal, A. Raas-Rothschild, T. Braulke, Mucopolidosis II is caused by mutations in *GNPTA* encoding the alpha/beta GlcNAc-1-phosphotransferase., *Nat. Med.* 11 (2005) 1109–12. doi:10.1038/nm1305.
- [3] Raas-Rothschild, V. Cormier-Daire, M. Bao, E. Genin, R. Salomon, K. Brewer, M. Zeigler, H. Mandel, S. Toth, B. Roe, A. Munnich, W.M. Canfield, Molecular basis of variant pseudo-hurler polydystrophy (mucopolidosis IIIC), *J. Clin. Invest.* 105 (2000) 673–81. doi:10.1172/JCI5826.
- [4] M. Bao, J.L. Booth, B.J. Elmendorf, W.M. Canfield, Bovine UDP- N -acetylglucosamine : Lysosomal-enzyme N -Acetylglucosamine-1-phosphotransferase I Purification and Subunit Structure, 271 (1996) 31437–31445.
- [5] M. Kudo, M. Bao, A. D’Souza, F. Ying, H. Pan, B. a Roe, W.M. Canfield, The alpha- and beta-subunits of the human UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase [corrected] are encoded by a single cDNA., *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 36141–9. doi:10.1074/jbc.M509008200.
- [6] Y. Qian, I. Lee, W.-S. Lee, M. Qian, M. Kudo, W.M. Canfield, P. Lobel, S. Kornfeld, Functions of the alpha, beta, and gamma subunits of UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase., *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 3360–70. doi:10.1074/jbc.M109.068650.

- [7] S. Cathey, J.G. Leroy, T. Wood, K. Eaves, R.J. Simensen, M. Kudo, R.E. Stevenson, M.J. Friez, Phenotype and Genotype in Mucopolysaccharidosis II and III alpha/beta: A Study of 61 Probands, *J. Inher. Metab. Dis.* 47 (2010) 38–48. doi:10.1136/jmg.2009.067736.Phenotype.
- [8] G.K. Cury, U. Matte, O. Artigalás, T. Alegra, R. V. Velho, F. Sperb, M.G. Burin, E.M. Ribeiro, C.M. Lourenço, C. a Kim, E.R. Valadares, M.F. Galera, a X. Acosta, I.V.D. Schwartz, Mucopolysaccharidosis II and III alpha/beta in Brazil: analysis of the GNPTAB gene., *Gene*. 524 (2013) 59–64. doi:10.1016/j.gene.2013.03.105.
- [9] J.G. Leroy, R.I. Demars, Mutant enzymatic and cytological phenotypes in cultured human fibroblasts., *Science*. 157 (1967) 804–6. doi:10.1126/science.157.3790.804.
- [10] S. Kornfeld, W.S. Sly, PART 16: LYSOSOMAL DISORDERS Chapter 138: I-Cell Disease and Pseudo-Hurler Polydystrophy: Disorders of Lysosomal Enzyme Phosphorylation and Localization Stuart Kornfeld, William S. Sly, in: *Online Metab. Mol. Bases Inherit. Dis.*, 2010: pp. 1–31.
- [11] P.D. Stenson, M. Mort, E. V Ball, K. Shaw, A. Phillips, D.N. Cooper, The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine., *Hum. Genet.* 133 (2014) 1–9. doi:10.1007/s00439-013-1358-4.
- [12] R.V. Velho, R. De Pace, Sarah Klünder, F.S.- Ludwig, C.M. Lourenço, I. V.D. Schwartz, T. Bräulke, S. Pohl, Analyses of disease-related GNPTAB mutations define a novel GlcNAc-1- phosphotransferase interaction domain and an alternative site-1 protease cleavage site, (2015) 1–34.
- [13] I. a Adzhubei, S. Schmidt, L. Peshkin, V.E. Ramensky, A. Gerasimova, P. Bork, A.S. Kondrashov, S.R. Sunyaev, A method and server for predicting damaging missense mutations., *Nat. Methods*. 7 (2010) 248–249. doi:10.1038/nmeth0410-248.
- [14] P.C. Ng, S. Henikoff, Predicting Deleterious Amino Acid Substitutions, (2001) 863–874. doi:10.1101/gr.176601.1.
- [15] H. Ashkenazy, E. Erez, E. Martz, T. Pupko, N. Ben-Tal, ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) W529–W533. doi:10.1093/nar/gkq399.
- [16] G. Celniker, G. Nimrod, H. Ashkenazy, F. Glaser, E. Martz, I. Mayrose, T. Pupko, N. Ben-Tal, ConSurf: Using Evolutionary Data to Raise Testable Hypotheses about Protein Function, *Isr. J. Chem.* 53 (2013) 199–206. doi:10.1002/ijch.201200096.
- [17] R. De Pace, M.F. Coutinho, F. Koch-Nolte, F. Haag, M.J. Prata, S. Alves, T. Bräulke, S. Pohl, Mucopolysaccharidosis II-related mutations inhibit the exit from the endoplasmic reticulum and proteolytic cleavage of GlcNAc-1-phosphotransferase precursor protein (GNPTAB)., *Hum. Mutat.* 35 (2014) 368–76. doi:10.1002/humu.22502.
- [18] B. Tappino, S. Regis, F. Corsolini, M. Filocamo, An Alu insertion in compound heterozygosity with a microduplication in GNPTAB gene underlies Mucopolysaccharidosis II., *Mol. Genet. Metab.* 93 (2008) 129–33. doi:10.1016/j.ymgme.2007.09.010.
- [19] M. Encarnação, L. Lacerda, R. Costa, M.J. Prata, M.F. Coutinho, H. Ribeiro, L. Lopes, M. Pineda, J. Ignatius, H. Galvez, a Mustonen, P. Vieira, M.R. Lima, S. Alves, Molecular analysis of the GNPTAB and GNPTG genes in 13 patients with mucopolysaccharidosis type II or type III - identification of eight novel mutations., *Clin. Genet.* 76 (2009) 76–84. doi:10.1111/j.1399-0004.2009.01185.x.
- [20] M. Kudo, M.S. Brem, W.M. Canfield, Mucopolysaccharidosis II (I-cell disease) and

mucopolipidosis IIIA (classical pseudo-hurler polydystrophy) are caused by mutations in the GlcNAc-phosphotransferase alpha / beta -subunits precursor gene., *Am. J. Hum. Genet.* 78 (2006) 451–63. doi:10.1086/500849.

- [21] Y. Qian, E. van Meel, H. Flanagan-Steet, A. Yox, R. Steet, S. Kornfeld, Analysis of Mucopolipidosis II/III Missense Mutations Identifies Domains of UDP-GlcNAc:lysosomal Enzyme GlcNAc-1-phosphotransferase Involved in Catalytic Function and Lysosomal Enzyme Recognition, *J. Biol. Chem.* 290 (2014) 3045–3056. doi:10.1074/jbc.M114.612507.
- [22] B. Tappino, N. a. Chuzhanova, S. Regis, A. Dardis, F. Corsolini, M. Stroppiano, E. Tonoli, T. Beccari, C. Rosano, J. Mucha, M. Blanco, M. Szlago, M. Di Rocco, D.N. Cooper, M. Filocamo, Molecular characterization of 22 novel UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase - α and β -subunit (GNPTAB) gene mutations causing mucopolipidosis types II α/β and III α/β in 46 patients, *Hum. Mutat.* 30 (2009) 956–973. doi:10.1002/humu.21099.
- [23] R. Bargal, M. Zeigler, B. Abu-Libdeh, V. Zuri, H. Mandel, Z. Ben Neriah, F. Stewart, N. Elcioglu, T. Hindi, M.L. Merrer, G. Bach, A. Raas-Rothschild, When Mucopolipidosis III meets Mucopolipidosis II: GNPTA gene mutations in 24 patients, *Mol. Genet. Metab.* 88 (2006) 359–363. doi:10.1016/j.ymgme.2006.03.003.
- [24] J. Thusberg, M. Vihinen, Pathogenic or not? and if so, then how? Studying the effects of missense mutations using bioinformatics methods, *Hum. Mutat.* 30 (2009) 703–714. doi:10.1002/humu.20938.
- [25] Y. Tzeng, C. Noble, D.S. Stephens, Genetic Basis for Biosynthesis of the (\square 134) - Linked N-Acetyl- D -Glucosamine 1-Phosphate Capsule of Neisseria meningitidis Serogroup X, *Society.* 71 (2003) 6712–6720. doi:10.1128/IAI.71.12.6712.

Supplementary Table 1 – Primers and annealing temperatures

	Forward	Reverse	Annealing Temperature (°C)
Exon 1	gggttggaggaaaggagccaca	ggggacgccgagacagg	66
Exon 2	ccacatcctttaaacctcttg	gctaaagtgaacacatcagatgg	55
Exon 3	cataatctctgggtttaaacctgtg	cctcccactccactccc	62
Exon 4	ccgtcttggttacagtgggagg	cctccccagtgcagtgaagc	65
Exon 5	ggtggggatcttattaatgggag	ggttaaggccaaaatacaatagc	59
Exon 6/7	gtgttctgccagacaccatagttg	ggaccacaagaaaagaatcacac	62
Exon 8	gggaggcggagggtgagg	cctctctgtaagtccccttc	66
Exon 9/10	gcacctgagagcagagggg	gatccaccacctccgcc	64
Exon 11	cgctcagtaagaacggtaacg	cctcccagtcagctttgc	56
Exon 12	caccacaccagtcagaaactg	gcaaggetggtaaaggatacac	57
Exon 13.1	catggcccctgcacaag	cctgttttctgtggagcc	62
Exon 13.2	ggagagcccaggaagagg	cctaaactacaaaatggggaca	60
Exon 14	ccgttaacatgtatttcatttgc	gcaacaactcaaacacgagc	55
Exon 15	gctcgtgttgagttgttgc	cctcagatcccaaagtgc	62
Exon 16	accacagtcattactacaatgcg	cctgctgctagtctgaagtgc	61
Exon 17	cctccagagagcatagaatcaa	agccagaccttgtgattacttt	56
Exon 18	gtggatgttgagtcactacggt	ctatctctactcaaccaccagctc	62
Exon 19	cccatagctaaaaggccatctacc	gtatacactcaccacacacatgc	58
Exon 20	gaagtcctctctcctgctgg	gactgttatatttgcctgaa	64
Exon 21	ttggaagaggaatgatggagat	gcaatcactccagctggc	62

6.2 - Desenvolvimento e avaliação de um protocolo para a pesquisa de alterações patogênicas em *GNPTAB* (artigo em desenvolvimento)

Desenvolvimento e Avaliação de um Protocolo para a Pesquisa de Alterações Patogênicas em *GNPTAB*

Ludwig NF^{1,2,4}, Sperb-Ludwig F^{1,2,4} e Schwartz, IVD^{2,3,4,5}.

1- Centro de Terapia Gênica - Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Porto Alegre - Brasil

2- Laboratório BRAIN - Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Porto Alegre - Brasil

3- Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre – Brasil

4- Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre – Brasil

5- Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Porto Alegre – Brasil

Corresponding Author:

Ida Vanessa D. Schwartz, MD, PhD

Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350 – Porto Alegre – RS – Brasil – 90035-003

E-mail: ischwartz@hcpa.edu.br

Tel: +55-51-33598309, Fax: +55-51-33598010

Resumo

Introdução: O gene *GNPTAB* está localizado no cromossomo 12, possui 21 éxons e codifica uma proteína precursora de 1225 aminoácidos que origina as subunidades α e β da GlcNAc-fosfotransferase. Alterações patogênicas em *GNPTAB* podem ocasionar as Mucopolidoses II ou III (ML II ou III) alfa/beta, doenças lisossômicas de herança autossômica recessiva. Há mais de 140 alterações patogênicas descritas neste gene.

Objetivos: Desenvolver um protocolo de pesquisa de alterações patogênicas em *GNPTAB*, específico para pacientes brasileiros com ML II ou III alfa/beta, e realizar a sua análise de custo. **Metodologia:** Foram incluídos dados sobre a genotipagem de 25 pacientes brasileiros não-relacionados com ML II/III, já publicados na literatura, e que tiveram ambas as mutações patogênicas de *GNPTAB* identificadas por sequenciamento de seus éxons e regiões flanqueadoras pelo método Sanger. Etapa 1) Análise das frequências, por éxons, das mutações em *GNPTAB* encontradas em 15/25 pacientes (grupo A), e definição da sequencia de éxons a ser pesquisada (protocolo 1); Etapa 2) aplicação do protocolo 1 nos demais 10 pacientes (grupo B); 3) Compilação dos dados da etapas 1 e 2, proposição do protocolo 2 e aplicação do mesmo na amostra total (grupo C) ; 4) Comparações de eficiência financeiras entre os protocolos, e desses com o Sequenciamento de Nova Geração (NGS) e sequenciamento de todo o gene.

Resultados: Foram identificadas alterações em 10/21 éxons de *GNPTAB*. A análise de custos demonstrou que, no grupo C, o protocolo 2 finalizaria o diagnóstico com uma redução de custos de 25% em relação ao protocolo 1, e que o NGS associa-se a maior custo que o protocolo 2. **Conclusão:** Com base nos dados obtidos, propõe-se a investigação genética dos pacientes com ML II e III alfa/beta por meio de sequenciamento Sanger e seguindo o protocolo 2, o qual é composto pelas seguintes etapas: 1) éxon 19; 2) éxons 10, 13.1 e 13.2; 3) éxons 3, 8 e 12; 4) éxons 14, 17 e 20; 5) demais éxons.

Palavras chave: *GNPTAB*, diagnóstico molecular, sequenciamento por Sanger, sequenciamento de nova geração.

Introdução

Segundo a American College of Medical Genetics and Genomics, a informação genética tem importância clínica quando levar a resultados positivos na saúde do paciente, confirmar um diagnóstico, determinar o tratamento ou prevenir uma doença. Além de implicações no prognóstico, benefícios psicológicos e para a saúde geral dos pacientes e seus familiares, a informação genética determina o diagnóstico e tem importância individual, familiar e para a sociedade em geral (ACMG Board of Directors 2015; Drobniowski et al. 2015).

O gene *GNPTAB* está localizado no cromossomo 12q23.3, e compreende 21 éxons e 85 kB. O gene codifica uma proteína precursora de 1256 aminoácidos e massa de 144 kDA, com 19 sítios de glicosilação e que, por clivagem proteolítica no Complexo de Golgi, origina as subunidades α e β maduras (Tiede et al. 2005). Em associação com a subunidade γ codificada pelo gene *GNPTG*, formam o complexo hexamérico da GlcNAc-fosfotransferase ($\alpha^2\beta^2\gamma^2$) (Raas-Rothschild et al. 2000).

A GlcNAc-fosfotransferase participa do processo de adição de marcadores de manose-6-fosfato (M6P) em hidrolases lisossômicas, através da adição de resíduos de GlcNAc-fosfato. Sequencialmente, a enzima descobridora realiza a remoção do GlcNAc, expõe o resíduo de M6P e possibilita que estas enzimas sejam reconhecidas pelos receptores de M6P e endereçadas aos compartimentos lisossomais. Uma vez que GlcNAc-fosfotransferase está defeituosa ou ausente, as hidrolases lisossômicas falham em adentrar nos compartimentos lisossomais e acabam sendo extravasadas ao ambiente extracelular (Braulke, Raas-Rothschild, and Kornfeld 2015; Sabatini and Adesnik 2015).

Alterações patogênicas em *GNPTAB* podem causar duas doenças distintas. A primeira delas, a Mucopolidose II (MLII; MIM#252500) é a forma mais grave e agressiva da doença, que pode apresentar sintomas já ao nascimento e levar os pacientes a óbito ainda na primeira década de vida. Estão associadas a doença atividades residuais da GlcNAc-fosfotransferase muito baixas (<2%) ou nulas. A segunda doença, a Mucopolidose III alfa/beta (MLIII alfa/beta; MIM#252600) é uma doença que apresenta sintomas mais leves e que surgem mais tarde, evolução da doença mais lenta e está associada a atividades residuais da GlcNAc-fosfotransferase entre 2-15% (Braulke,

Raas-Rothschild, and Kornfeld 2015; Cathey et al. 2008). As ML II e III alfa/beta são doenças raras que têm a sua incidência estimada entre 1:123.500 em Portugal e 1:650.000 na Holanda. Em Quebec, no Canada, têm-se 1:6.184 nascidos vivos (Pinto et al. 2004; Plante et al. 2008; Poorthuis et al. 1999).

A relação causal entre alterações patogênicas em *GNPTAB* e MLII e MLIII alfa/beta é bem estabelecida. Até o presente, já foram descritas 144 alterações patogênicas nesse gene, associadas à ML II ou III; a maioria é de ocorrência rara e não parecer haver uma região do gene mais frequentemente afetada uma vez que todos os éxons apresentam alterações. Única exceção a essa regra parece ser a deleção c.3503_3504delTC, localizada no éxon 19 (Tabela 1). Essa alteração ocorre em uma repetição TCTC, o que pode predispor à ocorrência desta alteração. A análise de haplótipos oriundos de populações mundiais possibilita a inferência de que todos são descendentes do mesmo ancestral, e que a alteração ocorreu há mais de 2000 mil anos na região mediterrânea da Europa (Coutinho et al. 2011).

Tabela 1 - Alterações mais frequentemente encontradas em *GNPTAB*, de acordo com o país de origem dos pacientes.

Referência	Pacientes	País	Alteração mais frequente	Frequência do alelo (%)
Bargal et al. 2006	24	Israel/Palestina	c.3503_3504delTC	50
Cathey et al. 2010	61	EUA	c.3503_3504delTC	22,3
Cury et al. 2013; Sperb-Ludwig et al. (2015) Velho et al. (2015) Ludwig et al. 2016;	26	Brasil	c.3503_3504delTC	37,5
Encarnação et al. 2009	13	Portugal	c.3503_3504delTC	45
Kudo et al. 2006	16	Inglaterra	c.3503_3504delTC	40,6
Ludwig et al. 2016	14	Brasil	c.3503_3504delTC	40
Otomo et al. 2009	40	Japão	c.3565C>T (p.Arg1189*)	41,25
Plante et al. 2008	12	Canada	c.3503_3504delTC	100
Tappino et al. 2009	46	Itália	c.3503_3504delTC	51

Até o momento, já foram publicados dados sobre alterações patogênicas em *GNPTAB* referentes a 26 pacientes brasileiros com ML II/III: Cury et al. (2013) identificaram 9 alterações em 12 pacientes, Sperb-Ludwig et al. (2015) identificaram as duas alterações em 1 paciente, Velho et al. (2015) descreveram as 2 alterações em 1 paciente, e Ludwig et al. (2016) (não publicado) descreveram 12 alterações em 14

pacientes (dois já descritos por Cury et al., 2013). Devido à heterogeneidade alélica de *GNPTAB* e ao seu elevado número de éxons, o objetivo desse trabalho é desenvolver um protocolo de investigação dos pacientes com ML II e III, baseado nas frequências das alterações patogênicas previamente identificadas em pacientes brasileiros, a fim de buscar um diagnóstico molecular eficiente, rápido e custo efetivo para essas doenças no país.

2. Materiais e Métodos

2.1. Pacientes

Dados sobre a análise de DNA de 25/26 pacientes brasileiros não relacionados foram incluídos nesse estudo (região Sul = 2; Sudeste = 11; Centro-Oeste = 2; Nordeste = 10; Norte: 0). Foi excluído desta análise um paciente com diagnóstico bioquímico de ML II pois o mesmo não possui material biológico disponível, mas cujo DNA materno foi investigado (Ludwig et. al., 2016 – ainda não publicado).

O diagnóstico bioquímico de ML II ou III alfa/beta dos mesmos foi realizado no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA), Brasil, como descrito por Cury et al., (2013). O diagnóstico molecular foi realizado como o descrito por Ludwig et. al., (2016 – ainda não publicado). O SGM-HCPA é centro de referencia para o diagnóstico de doenças lisossômicas no país, e o único laboratório que realiza a genotipagem, como pesquisa, de *GNPTAB* e *GNPTG* (essa análise também não é disponibilizada pelo Sistema Único de Saúde). Desde 2010, o SGM-HCPA inclui linha de pesquisa específica sobre ML II e III, com coleta ativa de dados clínicos, bioquímicos e genéticos de pacientes diagnosticados com essas doenças no país (projeto aprovado pelo Comitê de Ética local). Dessa forma, acredita-se que a amostra ora analisada seja representativa da população brasileira de ML II e III alfa/beta.

As informações genótípicas dos pacientes incluídos nesse estudo estão descritas em detalhes nos trabalhos de Cury et al., (2013) (n=10 pacientes), Sperb-Ludwig et al., (2015) (n=1 paciente), Velho et al., (2015) (n=1 paciente) e Ludwig et al. (2016) (n=13 pacientes; ainda não publicado). Todos os pacientes tiveram todos os éxons de *GNPTAB*

sequenciados pelo método de Sanger, e todos tiveram as duas alterações patogênicas identificadas. O éxon 13 de *GNPTAB* possui 1300 nucleotídeos e é amplificado por dois pares de primers (13.1 e 13.2), que serão considerados como éxons diferentes nesse estudo.

O grupo designado como A compreende dez pacientes descritos por Cury et al. (2013), o paciente de Sperb-Ludwig et. al. (2015), o paciente de Velho et. al. (2015) e três pacientes (dois já citados em Cury et. al., 2013) de Ludwig et. al. (2016), totalizando 15 pacientes; nesse grupo, como dois pacientes são filhos de pais consanguíneos, a contagem total de alelos foi de 28. Tais pacientes tiveram seus éxons analisados sem uma ordem específica. O grupo B é composto por parte dos pacientes descritos no trabalho de Ludwig et. al. (2016 - 10 pacientes); neste grupo, apenas o paciente 25 é filho de pais consanguíneos, portanto a contagem total de alelos foi de 19. A sequência de éxons investigada nestes pacientes foi baseada no Protocolo 1 (ver abaixo). O grupo C é composto por ambos os grupos (25 pacientes, 47 alelos).

2.2. Desenvolvimento do protocolo 1

O protocolo 1 foi desenvolvido levando em consideração a posição (éxon afetado) das mutações patogênicas encontradas no grupo A. O protocolo foi definido em etapas, seguindo uma ordem decrescente a iniciar pelo éxon mais frequentemente afetado, sendo que aqueles que apresentam uma frequência semelhante foram agrupados em uma mesma etapa.

2.3. Desenvolvimento do protocolo 2

O protocolo 2 foi desenvolvido levando em consideração a posição (éxon afetado) das mutações patogênicas encontradas no grupo A e B, seguindo as mesmas regras de síntese do protocolo 1 descritas acima.

2.4. Estimativas de tempo e custo

O tempo médio para o diagnóstico molecular foi calculado levando em consideração o intervalo, em dias, entre a data do recebimento da primeira e última amostra sequenciada do paciente.

Para a análise financeira foi realizado um levantamento de todos os materiais consumíveis, equipamentos utilizados e recurso humano para a realização do diagnóstico molecular. Foi utilizado o custo por unidade, dos itens de consumo, que melhor se adequa ao levantamento do valor total, por exemplo, foi calculado o custo de uma ponteira ou de 1mL de Etanol absoluto. Para os equipamentos, a vida útil foi expressa na unidade de tempo (hora, minuto ou segundo) que melhor se adequa ao tempo utilizado de cada equipamento nas técnicas, e esse valor foi então dividido pelo valor de aquisição do equipamento. Com esses valores se calculou o custo de cada item de consumo e equipamento em cada uma das técnicas, através da multiplicação do custo por unidade pela quantidade utilizada na técnica. A soma do valor de utilização total de cada item e equipamento definiu o valor de cada uma das técnicas, que foram então multiplicadas pelo número de vezes que cada uma delas foi utilizada para finalizar o diagnóstico molecular de cada paciente.

As técnicas avaliadas foram a extração de gDNA com kit comercial, a reação em cadeia da polimerase, a purificação com PEG8000/NaCl e a quantificação de DNA no Nanodrop. Para a estimativa do custo total, todos os pacientes receberam o valor de uma extração de gDNA e de PCR, purificação e eletroforese correspondente ao número de vezes que cada uma das técnicas foi necessária para finalizar o diagnóstico.

3. Resultados

Os dados referentes ao levantamento de todos os materiais utilizados e seus valores por unidade estão descritos na Tabela Suplementar 1. Vinte e cinco pacientes foram incluídos no estudo, e a sua origem geográfica é mostrada na Figura 1. A Tabela 2 sumariza os dados clínicos e genotípicos dos pacientes. Na figura 2, encontra-se ilustrado o número de alterações patogênicas por éxon de *GNPTAB*.

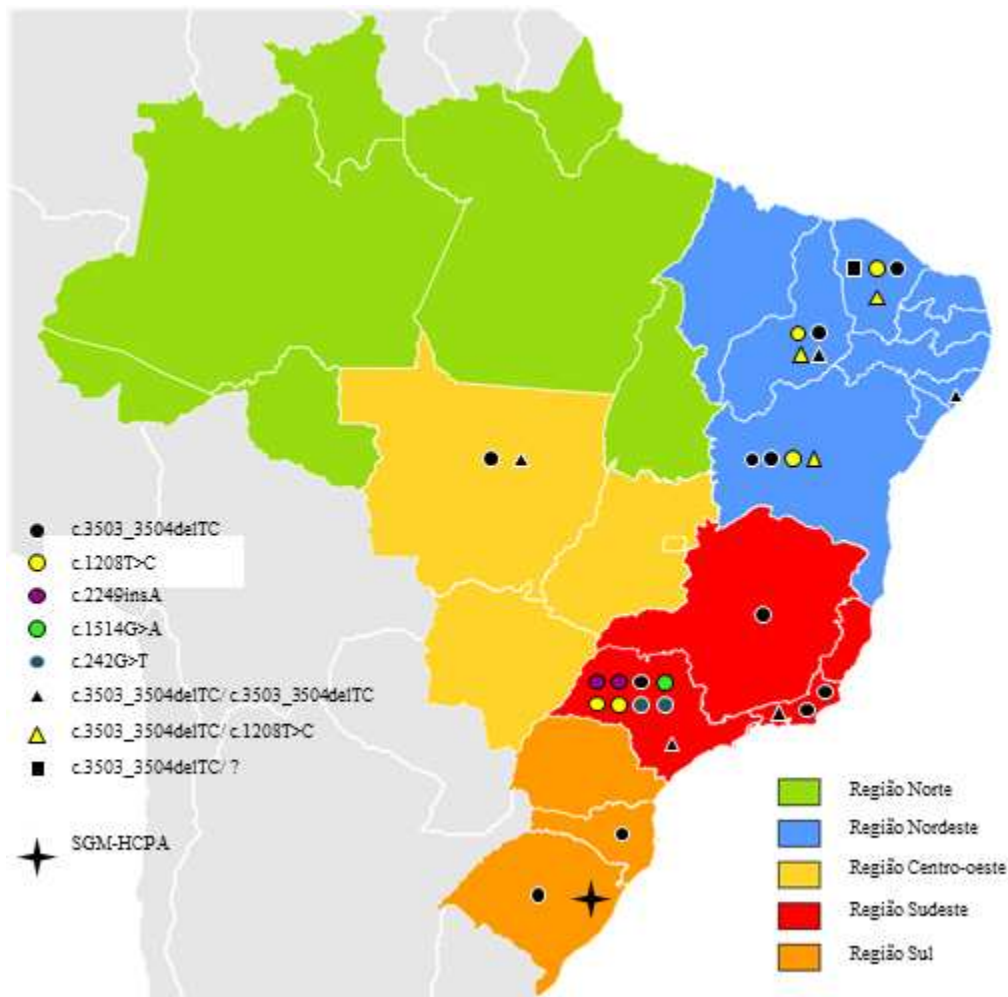


Figura 1 – Origem por estado e região brasileira dos pacientes com Mucopolidose II ou III alfa/beta incluídos e que apresentaram alterações patogênicas em *GNPTAB* recorrentes neste estudo.

Tabela 2 - Dados moleculares e localização das alterações patogênicas nos éxons nos 23 pacientes estudados.

Paciente	Fenótipo	Consanguinidade	Região de Origem	Genótipo (cDNA)	Localização Éxon	Referência	
				Alelo 1/ Alelo2			
GRUPO A	1	II	Não	Nordeste	c.3503_3504delITC/c.3503_3504delITC	19/19	Cury et. al., 2013
	2	II	Não	Centro-Oeste	c.3503_3504delITC/c.3503_3504delITC	19/19	Cury et. al., 2013
	3	III	Não	Sudeste	c.1931C>T/c.3668_3670delCTA	13.1/20	Velho et. al., 2015
	4	II	Não	Centro-Oeste	c.2808A>G/c.3503_3504delITC	14/19	Cury et. al., 2013
	5	II	Sim	Nordeste	c.3503_3504delITC/c.3503_3504delITC	19/19	Cury et. al., 2013
	6	III	Não	Sudeste	c.1514G>A/c.1759C>T	12/13.1	Cury et. al., 2013
	7	II	Não	Sudeste	c.2269_2273delGAAAC/c.2269_2273delGAAAC	13.2/13.2	Cury et. al., 2013
	8	III	Não	Sul	c.1196C>T/c.3503_3504delITC	10/19	Cury et. al., 2013
	9	II	Sim	Sudeste	c.3503_3504delITC/c.3503_3504delITC	19/19	Ludwig et. al., 2016
	10	III	Não	Sudeste	c.242G>T/c.2249insA	3/13.2	Ludwig et. al., 2016
	11	III	Não	Sudeste	c.1208T>C/c.1723G>A	10/13.1	Sperb-Ludwig et. al., 2015-
	12	II	Não	Sudeste	c.3503_3504delITC/c.1154C>T	19/10	Ludwig et. al., 2016
	13	III	Não	Nordeste	c.3503_3504delITC/c.1208T>C	19/10	Cury et. al., 2013
	14	III	Não	Sudeste	c.3503_3504delITC/?	19/?	Cury et. al., 2013
	15	II	Não	Nordeste	C.1123C>T/?	10/?	Cury et. al., 2013
GRUPO B	16	II	Não	Sudeste	c.3503_3504delITC/ c.2249insA	19/13.2	Ludwig et. al., 2016
	17	II	Não	Sul	c.3503_3504delITC/ c.831delT	19/8	Ludwig et. al., 2016
	18	II	Não	Sudeste	c.242G>T/c.1924_1927delAATT	3/13.1	Ludwig et. al., 2016
	19	III	Não	Sudeste	c.1208T>C/c.832C>T	10/8	Ludwig et. al., 2016
	20	II	Não	Nordeste	c.3503_3504delITC/c.3503_3504delITC	19/19	Ludwig et. al., 2016
	21	II	Não	Nordeste	c.1763insA/c.3333T>G	13.1/17	Ludwig et. al., 2016
	22	III	Não	Nordeste	c.3503_3504delITC/c.1514G>A	19/12	Ludwig et. al., 2016
	23	III	Não	Nordeste	c.3503_3504delITC/c.1208T>C	19/10	Ludwig et. al., 2016
	24	III	Não	Nordeste	c.3503_3504delITC/c.1208T>C	19/10	Ludwig et. al., 2016
	25	II	Sim	Nordeste	c.227A>G/c.277A>G	3/3	Ludwig et. al., 2016

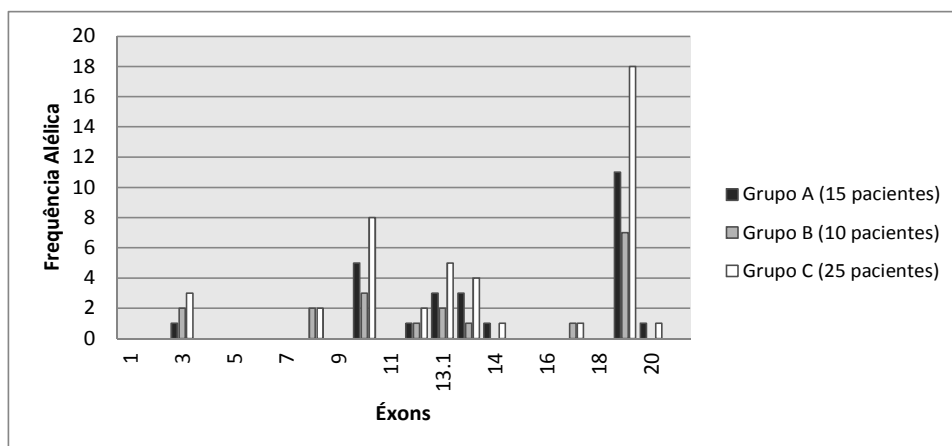


Figura 2 – Frequências de Alterações Patogênicas em cada éxon nos três grupos experimentais.

O protocolo 1 (Figura 3) foi sintetizado sobre as frequências alélicas dos pacientes do grupo A. Nesse grupo foram identificadas 13 alterações em 8 éxons (36%), o éxon 19 foi o mais frequentemente afetado (39,2%, n=11/28 alelos), em função da c.3503_3504delTC, seguido pelo éxon 10 (17,8%, n=5/28 alelos) onde foram identificadas 4 alterações patogênicas diferentes (c.1123C>T, c.1154C>T, c.1196C>T e c.1208T>C), pelo 13.1 (10,7%, n=3/28 alelos) (alterações c.1931C>T, c.1759C>T e c.1723G>A), pelo 13.2 (10,7%, n=3/28 alelos) (c.2269_2273delGAAAC e c.2249insA) e pelos éxons 3, 12, 14 e 20 (3,5%, n=1/28 alelos cada). Portanto, das 14 alterações identificadas, somente 2 ocorreram em mais de um paciente: c.3503_3504delTC e c.1208T>C. Caso tivesse sido aplicado, o protocolo 1 finalizaria o diagnóstico genético do grupo A na etapa 1 em 27% dos pacientes (n= 4/15), na etapa 2 para 27% dos pacientes (n=4/15) e na etapa 3 para 34% (n=5/15), 2 pacientes não teriam seu diagnóstico finalizado (12%).

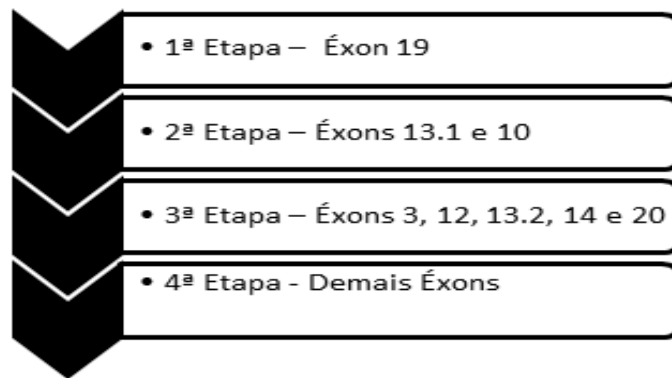


Figura 3 – Protocolo 1 de pesquisa de alterações patogênicas em *GNPTAB* por sequenciamento Sanger, e que foi desenvolvido a partir dos achados do Grupo A de pacientes (Cury et al. 2013; Sperb-Ludwig et al. 2015; Velho et al. 2015; Ludwig et. al., 2016).

No grupo B, foram identificadas 11 alterações patogênicas em 8 éxons diferentes (36% dos éxons). Novamente, o éxon mais frequentemente afetado foi o 19 (38,8%, n=7/18 alelos), em função da alteração c.3503_3504delTC; seguido pelo éxon 10 (16,6%, n=3/18 alelos), mas nesse grupo todas as alterações identificadas nesse éxon foram a c.1208T>C; pelos éxons 3, 8 e 13.1 (11,1%, n=2/18 alelos); e pelos éxons 12, 13,2 e 17 (5,5%, n=1/18 alelos cada). Das 10 alterações patogênicas encontradas, somente 2 alterações foram identificadas em mais de um paciente, a c.3503_3504delTC e a c.1208T>C. A aplicação do protocolo 1 finalizaria o diagnóstico molecular na etapa 1 para 1 paciente (10%), na etapa 2 para 2 pacientes (20%), na etapa 3 para 3 pacientes (30%) e na etapa 4 para 4 pacientes (40%) nesse grupo. Todos os pacientes teriam seu diagnóstico finalizado nesse grupo.

Com a análise dos dois grupos finalizada, temos 10 éxons (45%) com pelo menos um alelo afetado na amostra brasileira de pacientes brasileiros com ML II e III alfa/beta. Entre os Grupos A e B existem diferenças nos éxons afetados, bem como nas frequências de alelos afetados por éxon (Figura 1), e sobre essas discrepâncias realizamos uma atualização do protocolo (versão 2 – Figura 3). Na etapa 5 do protocolo 2 estão aqueles éxons em que ainda não foram identificadas alterações em pacientes com MLII e MLIII alfa/beta da população brasileira, e que foram ranqueados através da

frequência de alterações patogênicas seguindo a base de dados HGMD (acesso em 2015).

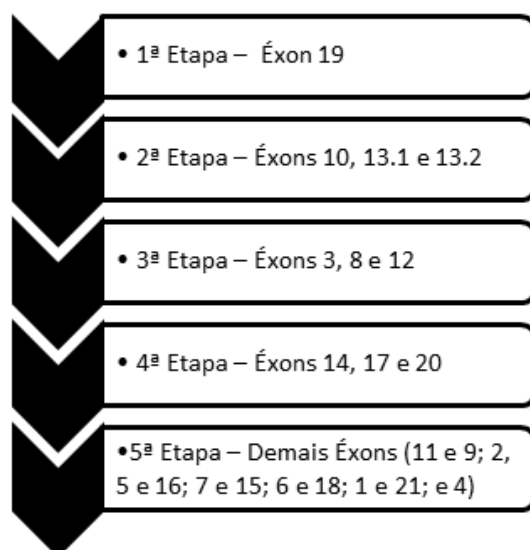


Figura 4 - Protocolo de pesquisa de alterações patogênicas em *GNPTAB* sintetizado a partir das frequências de alterações patogênicas em éxons nos 23 pacientes incluídos no presente estudo.

A comparação da aplicação dos Protocolos 1 e 2 para toda a amostra incluída no estudo está resumida nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Comparação dos protocolos no grupo C quanto à etapa de finalização do diagnóstico e éxons pesquisados (n= 25 pacientes).

	Protocolo 1	Protocolo 2
	Pacientes (n) / Frequência relativa (%) / Frequência acumulada (%)	Pacientes (n) / Frequência relativa (%) / Frequência acumulada (%)
Etapa 1	5 / 20 / 20	5 / 20 / 20
Etapa 2	6 / 24 / 44	8 / 32 / 52
Etapa 3	7 / 28 / 72	6 / 24 / 76
Etapa 4	4 / 16 / 88	3 / 12 / 88
Etapa 5		

Tabela 4 - Comparação dos parâmetros de avaliação nos diferentes grupos para os protocolos.

	Protocolo 1			Protocolo 2		
	Éxons pesquisados	Reações de PCR	Sequenciamentos realizados	Éxons pesquisados	Reações de PCR	Sequenciamentos realizados
Grupo A	100	441	155	102	450	158
Grupo B	119	524	184	58	256	90
Grupo C	219	965	339	160	705	248

Recentemente a plataforma NGS tornou-se disponível para a análise de *GNPTAB*, também como um serviço terceirizado. Sendo assim, uma análise financeira sobre o custo total do diagnóstico molecular através da metodologia atual e dos protocolos foi realizada, os resultados estimados para as técnicas utilizadas estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Estimativas do custo por técnica para o diagnóstico genética das Mucopolídeos II e III alfa/beta.

Técnica	Valor
Extração de gDNA (por amostra)	R\$ 24,07
Reação de PCR (para uma amostra)*	R\$ 4,29
Purificação com PEG8000 (para uma amostra)*	R\$ 2,05
Sequenciamento de Sanger (por éxon)	R\$ 21,00
Sequenciamento por NGS (por amostra)	R\$ 1.000,00

* Já incluído o valor de eletroforese.

Tabela 6 - Comparação financeira e de tempo dos protocolos.

	Protocolo 1		Protocolo 2	
	Custo Médio por paciente (intervalo)	Tempo Médio Diagnóstico (dias)	Custo Médio por paciente (intervalo)	Tempo Médio Diagnóstico (dias)
Grupo A	R\$ 311,28 (67,24 – 971,65)	96	R\$ 317,03 (67,24 – 971,65)	99
Grupo B	R\$ 536,67 (67,24 – 971,65)	166	R\$ 235,27 (60,57 – 388,13)	81
Grupo C	R\$ 338,45 (67,24 – 971,65)	125	R\$ 299,80 (67,24 – 971,65)	91

Em comparação a plataforma NGS, o custo médio por paciente do protocolo 1 para o grupo A é equivalente a 31,1% da plataforma, no grupo B é 53,6% e no grupo C é 33,8%. Já o custo médio por paciente do protocolo 2 para o grupo A é equivalente a 31,7% da plataforma, no grupo B é 23,5% e no grupo C é 29,9%. Em comparação ao sequenciamento do gene inteiro, o custo médio por paciente do protocolo 1 para o grupo A é equivalente a 32%, no grupo B é 55,2% e no grupo C é 34,8%. Já o custo médio por paciente do protocolo 2 para o grupo A é equivalente a 32,6% da plataforma, no grupo B é 24,2% e no grupo C é 30,8%. O protocolo 2 é 25% mais econômico em relação ao protocolo 1 no grupo C. Com relação ao tempo, o protocolo 2 é 27,2% mais eficaz do que o protocolo 1. O tempo da plataforma NGS é de dois dias para o resultado ser entregue.

4. Discussão

A amplificação de todos os éxons de *GNPTAB* é realizada através de 22 reações de PCR diferentes, o que torna o levantamento da informação molecular para todo o gene um processo demorado, trabalhoso e caro. Nesse contexto, a busca por um protocolo de pesquisa por alterações patogênicas é importante para diminuir o tempo e o custo do diagnóstico molecular para as MLs. Nesse sentido, nas 25 amostras de DNA de pacientes analisadas nesse trabalho, 23 deles poderiam ter seu diagnóstico molecular finalizado com a análise de menos da metade dos éxons presentes no gene *GNPTAB*. Os resultados das análises de simulação do presente trabalho, através das médias de éxons analisados nos Grupos B e C, demonstram essa constatação.

A alteração c.3503_3504delTC foi a mais identificada nos Grupos A (36%) e B (38,8%), e é reconhecidamente a mais frequente em várias populações mundiais (S. Cathey et al., 2010; Cury et al., 2013; Encarnação et al., 2009; Kudo et al., 2006; Tappino et al., 2009). Outra alteração que ganhou destaque na pesquisa de alterações foi a c.1208T>C, em função de ter sido identificada em três alelos no Grupo B, que em conjunto com as outras 3 alterações identificadas no Grupo A, fez com que a frequência de alterações no éxon 10 fosse a segunda mais alta em ambos os grupos.

As análises moleculares na população brasileira identificaram alterações patogênicas em 10 éxons até o presente momento, número que equivale a menos da metade dos éxons presentes no gene. Esse fato fez com que o protocolo 1 possuísse 14 éxons diferentes na sua última etapa, nenhum deles com alteração patogênica identificada. Se o Grupo B fosse diagnóstico por esse protocolo, as amostras 2 e 6 apresentariam alterações para éxons presentes nessa etapa (éxons 8 e 17). Se a pesquisa por alterações fosse realizada aleatoriamente nessa etapa, é possível que esse fato alongasse o tempo e aumentasse o custo do diagnóstico. Por esse motivo, para o protocolo 2, os éxons que apresentam alterações patogênicas seriam pesquisados primeiro, e aqueles que ainda não apresentaram nenhuma alteração seriam pesquisados segundo a frequência de alterações descritas no HGMD.

Como a elaboração do protocolo 1 foi realizada sobre as frequências genotípicas do grupo A, e o protocolo 2 sobre as frequências genotípicas do grupo C, a análise financeira dos dois protocolos nos grupos A e B são tendenciadas. É por esse motivo que o protocolo 1 é mais econômico do que o protocolo 2 no grupo A, e vice-versa com relação ao protocolo 2 ser mais econômico no grupo B. Desse modo, a análise comparativa dos protocolos é mais realista quando realizada no grupo C, que leva em consideração a frequência genotípica de todos os pacientes.

O levantamento do valor de todos os reagentes, materiais plásticos e equipamentos utilizados para realizar o diagnóstico molecular foram realizados para estimar o valor das técnicas utilizadas nesse trabalho. Concluímos que os valores estimados, dispostos na Tabela 5, se aproximam da realidade e podem ser utilizados para estudos financeiros de análises genéticas para outras doenças.

A síntese de um protocolo sequencial para a pesquisa de alterações patogênicas em genes de grande tamanho é uma estratégia simples e que visa encurtar o tempo para o

diagnóstico molecular e reduzir os gastos envolvidos no processo, sempre objetivando encontrar a maneira mais eficiente de disponibilizar os dados moleculares aos pacientes. Sendo assim, com a análise retrospectiva das frequências de alterações patogênicas em 25 pacientes com ML II ou III alfa/beta elaborou um protocolo que foi avaliado em caráter financeiro. Os resultados dessa abordagem permitiram a elaboração de um protocolo que finalizaria o diagnóstico molecular com uma redução de 25% das despesas e 27,2% do tempo, para atingir seus objetivos, e que no âmbito financeiro, é mais viável do que a plataforma NGS.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pelo Fundo de Incentivo a Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

Referências

- ACMG Board of Directors. 2015. “Clinical Utility of Genetic and Genomic Services: A Position Statement of the American College of Medical Genetics and Genomics.” *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics* 17(6): 505–7. <http://www.nature.com/doi/10.1038/gim.2015.41> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25764213>.
- Bargal, Ruth et al. 2006. “When Mucopolidosis III Meets Mucopolidosis II: GNPTA Gene Mutations in 24 Patients.” *Molecular Genetics and Metabolism* 88(4): 359–63.
- Braulke, Thomas, Annick Raas-Rothschild, and Stuart Kornfeld. 2015. “I - Cell Disease and Pseudo - Hurler Polydystrophy: Disorders of Lysosomal Enzyme Phosphorylation and Localization.” In *The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*, 1–31.
- Cathey, Sara et al. 2010. “Phenotype and Genotype in Mucopolidoses II and III Alpha/beta: A Study of 61 Probands.” 47(1): 38–48.

- Cathey, Sara S. et al. 2008. "Molecular Order in Mucopolysaccharidosis II and III Nomenclature." *American journal of medical genetics. Part A* 143A(18): 2106–12.
- Coutinho, M F et al. 2011. "Origin and Spread of a Common Deletion Causing Mucopolysaccharidosis Type II: Insights from Patterns of Haplotypic Diversity." *Clinical genetics* 80(3): 273–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20880125> (September 4, 2014).
- Cury, G K et al. 2013. "Mucopolysaccharidosis II and III Alpha/beta in Brazil: Analysis of the GNPTAB Gene." *Gene* 524(1): 59–64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23566849> (December 30, 2014).
- Drobniewski, Francis et al. 2015. "Systematic Review, Meta-Analysis and Economic Modelling of Molecular Diagnostic Tests for Antibiotic Resistance in Tuberculosis." *Health Technology Assessment* 19(34): 1–188.
- Encarnação, M et al. 2009. "Molecular Analysis of the GNPTAB and GNPTG Genes in 13 Patients with Mucopolysaccharidosis Type II or Type III - Identification of Eight Novel Mutations." *Clinical genetics* 76(1): 76–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19659762> (September 4, 2014).
- Kudo, Mariko, Michael S Brem, and William M Canfield. 2006. "Mucopolysaccharidosis II (I-Cell Disease) and Mucopolysaccharidosis IIIA (Classical Pseudo-Hurler Polydystrophy) Are Caused by Mutations in the GlcNAc-Phosphotransferase Alpha / Beta - Subunits Precursor Gene." *American journal of human genetics* 78(3): 451–63. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1380288&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Otomo, Takanobu et al. 2009. "Mucopolysaccharidosis II and III Alpha/beta: Mutation Analysis of 40 Japanese Patients Showed Genotype-Phenotype Correlation." *Journal of human genetics* 54(3): 145–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19197337> (September 4, 2014).
- Pinto, Rui et al. 2004. "Prevalence of Lysosomal Storage Diseases in Portugal." *European journal of human genetics : EJHG* 12(2): 87–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14685153>.
- Plante, M et al. 2008. "Mucopolysaccharidosis II: A Single Causal Mutation in the N-Acetylglucosamine-1-Phosphotransferase Gene (GNPTAB) in a French Canadian Founder Population." *Clinical genetics* 73(3): 236–44.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18190596> (December 30, 2014).
- Poorthuis, B. J H M et al. 1999. "The Frequency of Lysosomal Storage Diseases in The Netherlands." *Human Genetics* 105(1-2): 151–56.
- Raas-Rothschild et al. 2000. "Molecular Basis of Variant Pseudo-Hurler Polydystrophy (Mucopolidosis IIIC)." *The Journal of clinical investigation* 105(5): 673–81. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=289169&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sabatini, David D, and Milton B Adesnik. 2015. "The Biogenesis of Membranes and Organelles The Organization of the Eukaryotic Cell." In *The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*, , 1–132.
- Sperb-Ludwig, F. et al. 2015. "Exome Sequencing for Mucopolidosis III: Detection of a Novel GNPTAB Gene Mutation in a Patient with a Very Mild Phenotype." *Molecular Genetics and Metabolism Reports* 2: 34–37. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214426914000809>.
- Stenson, Peter D et al. 2014. "The Human Gene Mutation Database: Building a Comprehensive Mutation Repository for Clinical and Molecular Genetics, Diagnostic Testing and Personalized Genomic Medicine." *Human genetics* 133(1): 1–9.
- Tappino, Barbara et al. 2009. "Molecular Characterization of 22 Novel UDP-N-Acetylglucosamine-1-Phosphate Transferase - α and β -Subunit (GNPTAB) Gene Mutations Causing Mucopolidosis Types II α / β and III α / β in 46 Patients." *Human Mutation* 30(11): 956–73.
- Tiede, Stephan et al. 2005. "Missense Mutations in N-Acetylglucosamine-1-Phosphotransferase Alpha/beta Subunit Gene in a Patient with Mucopolidosis III and a Mild Clinical Phenotype." *American journal of medical genetics. Part A* 137A(3): 235–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16094673> (December 30, 2014).
- Velho, Renata Voltolini et al. 2015. "Analyses of Disease-Related GNPTAB Mutations Define a Novel GlcNAc-1- Phosphotransferase Interaction Domain and an Alternative Site-1 Protease Cleavage Site." : 1–34.

Materiais Suplementares

Tabela Suplementar 1 - Itens utilizados para o levantamento financeiro das técnicas para diagnóstico genético.

Item	Descrição	Vida Útil (anos)	Utilização na semana	Vida Útil (minutos)	Preço	Valor Unitário
Eppendorf 1,5	1000				R\$ 31,00	0,03100
Eppendorf 0,5	1000				R\$ 19,10	0,01910
Eppendorf 0,2	1000				R\$ 16,70	0,01670
1000 µL tip	1000				R\$ 25,00	0,02500
200 µL tip	1000				R\$ 10,20	0,01020
10 µL tip	1000				R\$ 13,00	0,01300
Luvax M	100 U				R\$ 13,90	0,13900
Tubo EDTA	unidades				R\$ 0,22	0,22000
Kit Easy-DNA	item				R\$ 2.300,00	23,00000
Primers 20pB	nMols				R\$ 42,00	0,000027
DNTP 100mM	mM				R\$ 1.100,00	0,22000
TAQ DNA polimerase	unidades				R\$ 230,00	1,38000
Tris	100g				R\$ 176,00	95,04000
Ácido Bórico	500g				R\$ 142,00	7,81000
EDTA	500g				R\$ 78,58	0,45891
Agarose	500g				R\$ 1.124,00	0,01686
NaCl	250g				R\$ 193,00	0,00338
PEG 8000	250g				R\$ 313,00	0,01878
Sybr Gold	500µL				R\$ 783,00	0,00783
Clorofórmio	1000mL				R\$ 43,30	0,03897
Etanol Absoluto	1000000µL				R\$ 73,00	0,00007
Centrífuga Cytospin	item	7	30%	2568384	R\$ 1.900,00	0,00074
Centrífuga (com rotor)	item	7	30%	2568384	R\$ 16.606,06	0,00647
Freezer -20	item	10		5241600	R\$ 1.769,00	0,01383
Banho seco	item	10	30%	3669120	R\$ 299,00	0,00057
Pipeta	item	1		524160	R\$ 1.676,98	0,00005
Vórtex	item	10	30%	3669120	R\$ 462,00	0,00013
ABI 2720 Veriti	Item	5	30%	1834560	R\$ 24.900,00	0,01357
Geladeira	Item	10			R\$ 129,00	0,00728
Nanodrop ND-2000	Item	5	30%	1834560	R\$ 42.322,64	0,02307
Peagâmetro	Item	5	30%	1834560	R\$ 200,00	0,00109
Cubas de Eletroforese	Item	5	30%	1834560	R\$ 2.934,00	0,00160
Micro-ondas	Item	5	30%	1834560	R\$ 300,00	0,00016

7 - Considerações Finais

As ML II e III alfa/beta são doença graves que podem apresentar os primeiros sintomas clínicos até a adolescência, são de curso progressivo rápido e agressivo, podendo ocasionar o óbito ainda na primeira década de vida. Por ainda não possuírem um tratamento específico disponível, exigem aos pacientes cuidados em tempo integral e expõe os familiares a períodos de sofrimento e gastos financeiros (Braulke, Raas-Rothschild, & Kornfeld 2015; Cathey et al., 2010).

As duas doenças são causadas por alterações patogênicas no gene *GNPTAB*, sendo as alterações que resultam em atividades enzimáticas residuais inferiores a 2% e superiores a 2% associadas à ML II e III alfa/beta, respectivamente. Apesar da relação bem documentada, o completo entendimento sobre a posição da alteração e a atividade residual do mutante ainda não foram completamente determinadas. Esforços têm sido realizados nos últimos anos a fim de determinar os domínios presentes na enzima e suas devidas funções na funcionalidade do complexo hexamérico da GlcNAc-fosfotransferase (De Pace et al., 2014, 2015; Qian et al., 2015; Velho et al., 2015).

Nesse contexto, o diagnóstico molecular dos pacientes é uma fonte de informação sobre qual resíduo, e conseqüentemente o domínio onde esse se encontra, são impactantes a função catalítica, localização intracelular e atividade enzimática residual do mutante. É a partir da informação genética do paciente que estudos mais complexos têm sido realizados e proporcionaram os recentes avanços sobre o entendimento da enzima que podem no futuro contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para a doença (van Meel et al., 2016; De Pace et al., 2014; Qian et al., 2015; Velho et al., 2015).

Assim, nesse trabalho descrevemos os achados moleculares de 14 pacientes brasileiros, não relacionados, com diagnóstico clínico e bioquímico de ML II e III alfa/beta. As informações aqui descritas contribuem para a confirmação da ocorrência em caráter raro da maior parte das alterações patogênicas em *GNPTAB*, as exceções são a alteração c.3503_3504delTC que, em conjunto com os dados publicados por Cury et al. (2013), é a mais frequentemente encontrada e corresponde a 41% dos alelos afetados na população brasileira, o que está de acordo com os índices encontrados em outras

populações mundiais. Outra alteração que ganhou destaque em nossa população foi a c.1208T>C, encontrada em cinco alelos e que corresponde a mais de 10% dos alelos afetados.

Além disso, o gene *GNPTAB* é considerado heterogêneo por apresentar um grande número de alterações, 144 já descritas (Stenson et al. 2014), e usualmente novos trabalhos que relatam informações moleculares descrevem alterações patogênicas ainda não descritas. Nesse novo trabalho são relatadas 6 novas alterações patogênicas em nossa população, o que confirma a alta heterogeneidade do gene (Bargal et al., 2006; Cathey et al., 2010; Encarnação et al., 2009; Tappino et al., 2009).

Dentre as 6 alterações patogênicas descritas, a c.1154C>T (p.Ser385Leu) foi identificada em uma paciente com ML II. Por ter sido encontrada em uma paciente com a forma mais grave da doença, é esperado que a alteração comprometesse gravemente a funcionalidade da enzima, para comprovar sua patogenicidade, realizamos a busca da mesma em indivíduos saudáveis na população brasileira. Nossa pesquisa em 200 alelos aleatórios não identificou nenhum alelo afetado e, após confirmação em DNA materno, finalizamos o diagnóstico molecular da paciente. Apenas alguns meses antes, no trabalho de Velho et al. (2015) os autores selecionaram randomicamente seis resíduos no domínio *Stealth 2*, entre eles os p.Leu380 e p.Glu389, realizaram mutagênese sítio-dirigida e os substituíram por Ala com subsequente análise funcional. Ambos os mutantes conseguem sair do RE e sofrem clivagem por S1P, ou seja, as alterações não afetam os mutantes. O que nos fez supor que o resíduo 385 poderia ter grande importância dentro desse domínio para a funcionalidade da GlcNAc-fosfotransferase.

Em consequência do exposto acima, entramos em contato com o Dr. Thomas Braulke, que possui grande experiência em análises funcionais com proteínas mutantes e que há anos dedica suas pesquisas as MLs, para estabelecer uma parceria. O resultado dessa iniciativa é o que o mutante p.Ser385Leu apresenta atividade residual de 1,5%, o que é encontrado em pacientes com a forma grave da doença e confirma nossas suspeitas de que esse resíduo possui um papel importante na funcionalidade da enzima. Estudos adicionais sobre a localização celular poderão nos indicar se a alteração afeta ou não o transporte do mutante ao complexo de Golgi.

Esses 25 novos alelos afetados também possuem uma importância quanto ao protocolo de pesquisa por alterações patogênicas para as MLs no Brasil. O gene

GNPTAB possui 21 éxons e a cobertura de toda a região dos éxons é realizada por 22 pares de primers diferentes através da técnica de PCR. Sendo assim, realizamos uma análise retrospectiva sobre 13 amostras de DNA e definimos um protocolo de pesquisa para alterações, onde buscamos pesquisar primeiro aqueles éxons com maiores frequências de alelos afetados em nossa população. Com esse protocolo foi realizado uma análise prospectiva do diagnóstico molecular em 9 pacientes, os resultados obtidos, e que estão descritos no artigo 2 dessa dissertação, evidenciam que uma estratégia simples como essa é eficaz. Uma segunda análise foi realizada, agora com o protocolo otimizado sobre as frequências alélicas por éxon dos 22 pacientes, e novamente os resultados observados são positivos. As médias de éxons que seriam pesquisados, bem como de reações de PCR e sequenciamentos, para finalizar o diagnóstico molecular seriam diminuídas.

Recentemente, o Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre adquiriu a plataforma de Sequenciamento de Nova Geração e está oferecendo a utilização deste serviço aos pesquisadores. Assim, surgiu a possibilidade de realizarmos o diagnóstico molecular através dessa plataforma, uma vez que um painel de genes incluindo *GNPTAB* está disponível. Sendo assim, decidimos realizar uma estimativa financeira do diagnóstico através do protocolo descrito no presente trabalho e comparar ao custo do diagnóstico através da plataforma NGS.

Nesse sentido, valores de reagentes e materiais plásticos atualizados foram incluídos e estimativas do custo de uma extração de gDNA, reação de PCR, purificação, eletroforese e sequenciamento foram calculadas. Após a o término das estimativas e realização das análises comparativas, destaca-se que a estratégia de busca pelas alterações patogênicas através do protocolo otimizado apresentaria um valor total para a conclusão do diagnóstico molecular menor do que a plataforma NGS e que o sequenciamento de *GNPTAB* por completo. Pretende-se futuramente incluir informações econômicas de gastos com energia elétrica e atualizar o custo médio por paciente.

Em conclusão, os resultados moleculares dos 14 pacientes com ML II ou III alfa/beta aqui descritos são importantes para o conhecimento a cerca do perfil de alterações patogênicas nos pacientes brasileiros, que direciona o protocolo, traça o perfil genético desta população e é ferramenta para aconselhamento genético e mesmo

diagnóstico pré-natal. Além disso, aprimora o entendimento das relações genótipo-fenótipo para a doença e sobre as funcionalidades dos domínios presentes na enzima. As seis novas alterações patogênicas relatadas confirmam o potencial efeito negativo das alterações do tipo mudança de fase de leitura e as duas alterações do tipo troca de sentido c.1154C>T e c.277A>G reafirmam a importância da pesquisa molecular e podem trazer indícios que irão ajudar no melhor entendimento da enzima.

A síntese do protocolo confirma a importância de metodologias para a pesquisa por alterações patogênicas, principalmente quando o gene onde se realiza a pesquisa possui um elevado número de éxons. A metodologia proposta nesse trabalho se mostrou efetiva, pois finalizaria o diagnóstico molecular com a pesquisa de menos da metade dos éxons de *GNPTAB*. É financeiramente importante porque sua utilização reduziria custos, que são menores que a plataforma NGS, para disponibilizar a informação genética aos pacientes e seus familiares.

8 - Perspectivas Futuras

Entre os objetivos futuros estão a realização de estudos funcionais com o intuito de caracterizar o mutante p.(Asp76Gly), que podem apresentar indícios sobre a função do domínio *Stealth* para a GlcNAc-fosfotransferase.

A versão 2.0 do protocolo de pesquisa por alterações patogênicas será validada com a realização do diagnóstico molecular de um novo grupo de pacientes. É possível que nesse processo identifiquem-se novas alterações ainda não descritas que, em conjunto com a detecção de novos alelos das alterações já encontradas na população brasileira, constituirá em mudanças nas frequências de alelos afetados por éxon. Em última instância, atualizações periódicas poderão ser feitas no protocolo a fim de buscar a maneira mais eficiente de realizar o diagnóstico molecular para a doença.

É interessante sempre manter em perspectiva a possibilidade de utilizar outras técnicas para o diagnóstico molecular das MLs no Brasil. Técnicas de *screening* para as alterações patogênicas mais frequentes, como a *High Resolution Melting*, podem ser discutidas e eventualmente incluídas como métodos diagnósticos. Como a plataforma NGS apresentou uma diminuição do valor por base sequenciada desde seu lançamento no mercado, uma possível redução pode tornar a plataforma financeiramente competitiva com o protocolo aqui descrito e, com evidentes pontos positivos como tempo de análise, ser empregada para o diagnóstico molecular dos pacientes.

Muitos dos pacientes descritos nesse trabalho são oriundos de outros estados do Brasil, esse fato dificulta a logística para obtenção de informações clínicas e acesso a amostras biológicas. Sendo assim, diferentes metodologias de coleta e armazenamento de amostras, como o papel filtro (*Dried Blood Spots* – DBS) e coletor de saliva, métodos não tão invasivos quanto à punção intravenosa, são interessantes pelas facilidades no transporte, armazenamento e extração de DNA. Discussões serão realizadas para avaliar a utilização dessas alternativas nos pacientes com MLs no Brasil, e se houver uma perspectiva positiva para a utilização de algumas delas no futuro, isso irá implicar em alterações nas técnicas empregadas e conseqüentemente no valor final do diagnóstico molecular.

Uma vez que as doenças monogênicas raras possuem muitos pontos em comum, a metodologia de pesquisa por alterações patogênicas descritas nesse trabalho podem ser aplicadas a outras doenças. Por evidentes resultados positivos e facilidade de inserção, os conceitos aqui empregados podem ser utilizados em outros contextos onde o diagnóstico molecular é importante. Sendo assim, discussões serão realizadas a fim de identificar as doenças onde esses conceitos poderão ser empregados.