



CENTRO UNIVERSITARIO DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

KLAUBER EVANGELISTA DE OLIVEIRA

**ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA FAMILIAR:
PRINCIPAIS GENES ASSOCIADOS**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado no formato de artigo científico ao UniCEUB como requisito parcial para a conclusão do Curso de Bacharelado em Biomedicina.

Orientador: Prof. Paulo Roberto Queiroz.

BRASÍLIA

2015

ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA FAMILIAR: PRINCIPAIS GENES ASSOCIADOS.

KLAUBER E. DE OLIVEIRA*

PAULO ROBERTO QUEIROZ**

Resumo

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é um distúrbio neurodegenerativo progressivo. Na forma esporádica, a mais prevalente e conhecida como a forma clássica, o seu diagnóstico é considerado finalístico, não apresentando um mecanismo patogênico padrão para a ELA. Este artigo consiste em uma revisão bibliográfica narrativa aonde foi abordada a ELA, apresentando os principais genes associados à evolução da doença. Estudos mostram que 5% a 10% dos portadores da ELA possuem a forma familiar da doença, estes apresentam mutação genética responsável pela degeneração: SOD1 (Superóxido dismutase 1); VAPB (Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C); FUS E TARDBP. Várias mutações já foram descritas, porém a dificuldade de se estabelecer uma etiologia desencadeada para cada tipo ainda é uma preocupação.

Palavras- Chave: esclerose lateral amiotrófica familiar, genes, mutação, epidemiologia.

FAMILIAL AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS: MAIN GENES ASSOCIATED.

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disorder. In the sporadic form, the most prevalent and known as the classical form, its diagnosis is considered finalistic, not presenting a standard pathogenic mechanism for ALS. This article consists of a narrative literature review where was addressed ALS, presenting its main genes associated with disease progression. Studies show that 5% to 10% of the ALS patients have the familial form of the disease, these have genetic mutation responsible for degeneration: SOD1 (superoxide dismutase 1); VAPB (Vesicle-associated membrane protein-associated protein B / C); FUS E TARDBP. Several mutations have been described, but the difficulty in establishing an etiology triggered for each type is still a concern.

Key-words: amyotrophic lateral sclerosis family, genes, mutation epidemiology.

* Graduando do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.
Klauber.93@hotmail.com

** Biólogo, MsC em Biologia Molecular – UnB, PhD em Biologia Animal – UnB, professor de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

1 INTRODUÇÃO

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é um distúrbio neurodegenerativo progressivo de evolução inicial linear, podendo ser trinta vezes mais rápida ou mais lenta (é difícil saber qual será o seu curso). Acomete os nervos motores superiores e inferiores no córtex motor, tronco cerebral e medula espinhal, o que causa uma disfunção muscular tanto em musculatura motora quanto respiratória (GALVÃO, 2013; NORDON; ESPÓSITO, 2009).

Estudos internacionais mostram números de 4 a 6 casos por 100.000 habitantes; já no Brasil calcula-se uma incidência de 2.500 novos casos por ano em uma incidência de 1,5 casos por 100.000 habitantes (XEREZ, 2008).

Segundo Quadros (2006) a primeira descrição da esclerose lateral amiotrófica no Brasil ocorreu na Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro. Tratava-se de paciente do sexo masculino, branco, 73 anos de idade, sem antecedentes hereditários. Começou com enfraquecimento da mão direita, sobretudo dos dedos. A fraqueza evoluiu gradualmente acompanhada de atrofia dos músculos da mão. Após algum tempo foram agravados os sintomas da ELA, com o aparecimento de atrofia nos músculos do tronco e paralisia nos membros inferiores, reflexos patelares exaltados, dificuldade para deglutir, insuficiência respiratória e acessos de sufocamento. Após 8 meses esse caso foi confirmado como ELA.

O diagnóstico para a ELA estabelecido pela WFN (*World Federation of Neurology* – Federação Internacional de Neurologia) segue os seguintes critérios: presença de: sinais de acometimento do neurônio motor inferior em uma ou mais de quatro regiões (bulbar, cervical, torácica e lombossacral); sinais de acometimento do neurônio motor superior em uma ou mais de quatro regiões; alterações do tipo neurogênicas na eletroneuromiografia, em músculos clinicamente normais; sinais de progressão em uma ou mais regiões. Ausência de: comprometimento sensitivo, autonômico e visual; síndrome de Parkinson; alterações em exames de neuroimagem de outras doenças que poderiam explicar os achados neurogênicos na eletroneuromiografia (PALERMO et al., 2009).

Na forma esporádica, a mais prevalente e conhecida como a forma clássica, o seu diagnóstico é considerado finalístico, não apresentando um mecanismo patogênico padrão para a ELA. Acredita-se que a ELA esporádica possua mecanismo etiopatogênico multifatorial, em função das múltiplas alterações encontradas em pacientes. Entre as etiologias sugeridas, a principal é a excitotoxicidade pelo neurotransmissor glutamato. Mas

também há evidências sugerindo participação da morte celular programada (apoptose), do acúmulo de neurofilamentos, da deficiência de fatores neurotróficos, de alterações da imunidade, de traumas físicos, de infecções virais persistentes, do processo de envelhecimento com deficiência relativa de vitamina E, e até mesmo, de fatores ambientais químicos e físicos. Estudos epidemiológicos mostram que de 5% a 10% dos portadores da ELA possuam a forma familiar da doença, estes apresentam mutação genética responsável pela degeneração (XEREZ, 2008; SILVA, 2006)

Treze regiões do genoma humano foram relacionadas a casos familiares na ELA, como algumas exemplificadas no quadro 1 (MAGALHÃES; ZATZ, 2006; NETO, 2009).

Quadro 1. Genética da ELA familiar.

TIPO ELA familiar	HERANÇA	LOCUS	GENE	PROTEÍNA
ELA 1	AD/AR	21q22.1	<i>SOD1</i>	Cu/Zn Superóxido dismutase
ELA 2	AR	2q33-2q35	<i>Alsina</i>	Alsina
ELA 4	AD	9q34	<i>SETX</i>	Senataxina
ELA 6	AD/AR	16p11.2	<i>FUS</i>	<i>Fused in Sarcoma</i>
ELA 8	AD	20q13.3	<i>VAPB</i>	VAMP
ELA 9	AD	14q11.2	<i>ANG</i>	Angiogenina
ELA 10	AD	1p36.2	<i>TARDBP</i>	TDP-43
ELA 12	AD/AR	10p13	<i>OPTN</i>	Optneurina
ELA 14	AD	9p13.3	<i>VCP</i>	VCP

AD = Autossômica Dominante.

AR = Autossômica Recessiva.

Fonte: adaptado de (CHEN et al., 2013).

Com base nessas informações, o objetivo desse trabalho foi apresentar a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) Familiar com respeito aos principais genes associados à evolução da doença.

2 METODOLOGIA

O trabalho foi realizado por meio de uma revisão bibliográfica narrativa, que segundo Cordeiro (2007), é aquela que expõe uma temática mais aberta, sem exigir um protocolo rigoroso, levando em conta que a pesquisa dos artigos é aleatória, sujeitando a ocorrência de viés de seleção. Foram utilizados documentos publicados nos últimos 15 anos (2000-2015). A busca foi realizada baseada em fontes científicas confiáveis em sites especializados, com grande número de artigos e conseqüentemente, maior número de informações disponíveis, tais como as bases: Scielo, PUBMED, Google acadêmico e EBSCO. As palavras chave para procura foram: *esclerose lateral amiotrófica familiar; genes; mutação; epidemiologia* (inglês e português).

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 ELA FAMILIAR

A ELA Familiar é dividida morfológicamente em dois tipos: uma é a forma clássica, idêntica a ELA Esporádica, e a outra forma com o envolvimento da coluna caracterizada pela degeneração das zonas da raiz média da coluna posterior (KATO et al., 2000).

Vários testes laboratoriais são realizados como diagnósticos de exclusão. Logo, o diagnóstico da ELA é definido por meio de exames clínicos, eletrofisiológicos ou mudanças neuropatológicas, evidenciando sinais de defeitos no neurônio motor inferior associado a defeitos no neurônio motor superior clinicamente comprovado com quadro crônico e progressivo (OLIVEIRA; PEREIRA, 2009).

De acordo com Kato e colaboradores (2000) os sintomas típicos são fraqueza assimétrica e atrofia local que eventualmente leva à paralisia completa. Outros sintomas incluem fasciculações musculares e efeitos bulbares, tais como, labilidade emocional do afeto (não necessariamente o humor), disartria e disfagia.

A idade avançada e o ataque bulbar são constantemente relatados nas piores conseqüências da doença. Não existem bem estabelecidos marcadores biológicos de progressão da doença. Os fatores prognósticos levam em conta a idade, condição respiratória

no início, tempo da doença, capacidade vital baixa, intensidade do cansaço, níveis de convulsão, atrofia e/ou fasciculações, tosse, resistência do músculo distal, depressão e dois parâmetros biológicos: níveis de creatina plasmática e contagem de neutrófilo (OLIVEIRA; PEREIRA, 2009).

Estudos epidemiológicos mostram que geralmente 5-10% dos pacientes com ELA tem um histórico familiar da doença. Uma das razões para a grande variedade nas frequências relatada é o uso de diferentes critérios de diagnósticos e a falha em reconhecer a penetrância reduzida da doença como um fenômeno comum na ELA Familiar (ANDERSEN, 2000).

Aproximadamente 80% dos casos da ELA familiar são ligados a genes ainda desconhecidos. A ELA esporádica possivelmente é também ligada a alterações em sistemas genéticos mais complexos (OLIVEIRA; PEREIRA, 2009). No estudo da ELA foram sugeridas as participações de alguns genes.

3.1.1 SOD1 (Superóxido dismutase 1)

Algumas formas da ELA resultam da mutação no gene codificador da enzima antioxidante $\text{Cu}^{+2}/\text{Zn}^{+2}$ superóxido dismutase (SOD1). Esse gene está localizado no cromossomo 21 (21q22.1), abrange 11 kb de comprimento no DNA cromossômico e consiste de 5 éxons interrompido por quatro íntrons. Os éxons codificam uma proteína de 153 aminoácidos (KATO et al., 2000).

Essa proteína localiza-se no citoplasma, núcleo, lisossomos e espaço intermembrânico mitocondrial. Tem a função de capturar íons de cobre e zinco e formar um homodímero, na qual realizará a função dismutase removendo radicais superóxido perigosos e metabolizando os em moléculas de oxigênio e peróxido de hidrogênio, na qual são convertidas em água e oxigênio pelas enzimas glutatona peroxidase e catalase (SACCON et al., 2013).

A proteína SOD1 é altamente conservada: a transferência do gene horizontal é programada para ocorrer em uma fase inicial da evolução do eucarioto. De fato, a proteína SOD1 humana é pelo menos 50% homóloga com proteínas SOD1 não-humanas de outras espécies de mamíferos. A estrutura tridimensional da proteína SOD1 é muito semelhante à da imunoglobulina: o padrão de dobramento (chave grega) na SOD1 se assemelha a região hipervariável (ligação ao antígeno) dobradas presentes na imunoglobulina (KATO et al., 2000).

Em diferentes populações, as proporções são de 12% a 23% dos pacientes diagnosticados com ELA Familiar e de 2% a 7% dos portadores da ELA esporádica carregam a mutação no gene *SOD1*. Por conta da produção de proteínas SOD1 alteradas originadas dessas mutações, a proteína codificada pelo alelo selvagem tem atividade normal, mas é reduzida em pacientes com ELA Familiar. Os níveis de atividade da enzima SOD1 mutante em pacientes com ELA Familiar são geralmente reduzidas em 25,3% a 93% da atividade em relação a indivíduos normais. A consequência disso é que os radicais superóxido não podem ser completamente retirados pela proteína alterada e o estresse oxidativo gerado por esses radicais superóxido desempenha um papel no efeito tóxico nos neurônios. Ticozzi (2011) apresenta estudos que mostram que a SOD1 mutante é propensa a dobramento incorreto e formação de agregados citoplasmáticos e, por sua vez, esses agregados podem levar à morte celular por sequestro de outras proteínas citoplasmáticas essenciais para a sobrevivência neuronal, por sobrecarga e bloqueio do sistema ubiquitina/proteossoma, por rompimento mitocondrial, do citoesqueleto ou transporte axonal (KATO et al., 2000; OLIVEIRA; PEREIRA, 2009)

Entre as teorias de ganho de função de como o gene *SOD1* mutante contribui para a morte do neurônio motor em uma associação com a ELA Familiar, quatro principais hipóteses até agora tem sido postuladas: toxicidade pelo radical hidroxila (OH⁻), toxicidade por nitração, toxicidade por cobre e toxicidade por agregação (KATO et al., 2000). Porém, o mecanismo exato pela qual as mutações na SOD1 conduzem a patologias da ELA é desconhecido, embora numerosas hipóteses tenham sido propostas para explicar a mediação da SOD1 mutante com a toxicidade, tal como, o enovelamento protéico associado à agregação, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, estresse do retículo endoplasmático, excitotoxicidade do glutamato, inflamação e ativação microglial e anormalidades no transporte axonal (CHEN et al., 2013).

Inicialmente surgiu a hipótese de que as mutações possam prejudicar a atividade enzimática da proteína, resultando no aumento dos níveis celulares de tipos de oxigênio reativo, estresse oxidativo e morte neural (TICOZZI et al., 2011). Segundo Oliveira e Pereira (2009) 20% das mutações na ELA Familiar na SOD1 causam enovelamento protéico e formação de inclusões intracelulares.

O estresse oxidativo induz a SOD1 normalmente a monomerizar como um intermediário no processo de formação de agregados e sabe-se que SOD1 não tem essa atividade superóxido desta forma quando mutada. Os neurônios motores são conhecidos por

serem particularmente sensíveis ao estresse oxidativo, o que torna esse processo potencialmente mais expresso nesse tipo de célula. As mudanças específicas na meia vida do RNA mensageiro da SOD1 e o efeito da agregação e monomerização da SOD1 na atividade superóxido, levanta a possibilidade de uma menor atividade da SOD1 nos neurônios afetados (SACCON et al., 2013).

Seis das mutações na *SOD1* em pacientes portadores da ELA familiar (A4V; L38V; L106V; I113T; L144F e V148G) são prováveis para desestabilizar a subunidade alça dobrável ou dímeros de contato, mudando a estrutura das proteínas normais (KATO et al., 2000).

A mutação mais frequente no gene *SOD1* é o D90A. Essa é uma mutação enigmática, não só por conta que ela mantém praticamente normal a atividade eritrocítica da $\text{Cu}^{+2}/\text{Zn}^{+2}$ -SOD1, mas também, pelo fato que ela tem atividade específica intacta e estabilidade preservada sob condições de desnaturação. Enquanto alguns dos casos heterozigotos para a mutação D90A, com linhagens de herança dominante e fenótipo agressivo e variável, todos os casos homozigotos para D90A, na qual na maioria dos casos é herdada como traço recessivo, tem mostrado a mesma característica fenotípica de paresia ascendente lenta, começando assimetricamente nas extremidades inferiores. Em quatro anos os primeiros sintomas distalmente nas extremidades superiores aparecem junto com os primeiros sintomas bulbares. Meses ou mesmo anos precedem o começo das paresias nas extremidades inferiores. Outras características atípicas em pacientes D90A homozigotos inclui alteração na bexiga, com urgência de micção e/ou dificuldade no início da micção, sensação de calor periódico e latência muito prolongada no motor central registrada após estimulação magnética transcraniana (ANDERSEN, 2000; OLIVEIRA; PEREIRA, 2009).

A atividade superóxido da SOD1 pode ser medida de duas formas: pela atividade intrínseca da SOD1, a qual reflete a eficiência enzimática da proteína; e a medida da atividade recombinante da proteína SOD1 normalizada para sua quantidade. Essa atividade é medida em pelo menos oito mutações proteicas, dando diversos resultados variando de 0 a 150% no alelo selvagem humano para a atividade da SOD1; ou pela atividade completa dentro da amostra de tecido, na qual pode ser afetada por vários fatores no ambiente celular, e isso é obtido pela atividade normal superóxido para a quantidade de tecido. Essa atividade é uma medida imparcial que leva em conta influências conhecidas e desconhecidas na atividade enzimática da SOD1. A atividade intrínseca influencia na atividade completa, mas somente

em um dos determinantes, os outros são quaisquer fatores que afetam a quantidade, disponibilidade biológica e funcionalidade da SOD1 (SACCON et al., 2013).

A atividade do SOD1 é geralmente reduzida pela metade em pacientes com ELA Familiar, como medido em glóbulos vermelhos, linfoblastos e fibroblastos. Evidências indiretas levantam a possibilidade de que uma redução severa pode ocorrer em tecidos suscetíveis e em determinados tipos de células, devido à redução da meia vida do RNA mensageiro da SOD1 mutante no Sistema Nervoso Central e devido aos possíveis efeitos do enovelamento e agregação da proteína SOD1. A atividade da SOD1 é normal ou apenas levemente reduzida em duas mutações: a D90A tanto nos pacientes homozigotos quanto nos heterozigotos; e a L117V em pacientes heterozigotos; embora a medida de um paciente homozigoto mostrasse uma redução de 67% da atividade da SOD1 quando comparada com indivíduos do grupo controle (SACCON et al., 2013).

As mutações na SOD1 são caracterizadas por uma importante variabilidade de fenótipos intrafamiliar e interfamiliar, em relação à idade e local do início das manifestações clínicas e duração da doença. Uma exceção é da mutação A4V, que é mais frequentemente observada em linhagens de casos da ELA1 e, constantemente, associada a uma alta penetrância, idades mais jovens no início, prevalência de sinais nos neurônios motores inferiores e uma progressão muito rápida da doença, geralmente em 12 meses (TICOZZI et al., 2011).

A penetrância das mutações na SOD1 é variável, sendo quase completa para a A4V e menor que 30% aos 70 anos para a I113T. Porém, a maioria das variantes descritas até agora são mutações privadas. Assim, a correlação genótipo e fenótipo pode ser descrita de forma segura por poucos deles (TICOZZI et al., 2011).

Não existe uma terapia específica para pacientes com mutação no gene SOD1, porém há muitos estudos em andamento com o objetivo de desenvolver novas técnicas (RNAi, terapia antisense) para a inativação dessa mutação, prevenindo a síntese citotóxica causada por este gene. Na área da imunoterapia foi desenvolvido um anticorpo chamado SEDI (*SOD1-Exposed-Dimer-Interface*), com sequenciamento peptídico correspondente a interface dimérica da SOD1, que reconhece o envelopamento ou proteínas SOD1 monoméricas com essa interface exposta (OLIVEIRA; PEREIRA, 2009).

3.1.2 VAPB (Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C):

O gene VAPB está localizada no cromossomo 20q13.3, abrange 57,7 kb de comprimento no DNA genômico e é composto por seis éxons e codifica a proteína VAMP (*Vesicle-associated membrane protein-associated protein B*). É uma proteína integral da membrana do retículo endoplasmático, a qual tem várias funções como no tráfego da vesícula intracelular, transporte de lipídio e na resposta de desdobramento protéico. Essas proteínas são associadas a membranas intracelulares incluindo tanto o retículo endoplasmático quanto o aparelho de Golgi (NISHMURA et al., 2004; TICOZZI et al., 2011; CHEN et al., 2013).

Uma mutação que causa a substituição da prolina 56 pela serina no domínio MSP (P56S) rompe a estrutura tridimensional e favorece a agregação dessa proteína. Dados sugerem que essa mutação é responsável por uma forma variável de doenças do neurônio motor encontradas em várias famílias, principalmente nas brasileiras. Pela interação da VAPB com outras proteínas, a mutação pode evoluir para uma interação menos estável das proteínas do retículo endoplasmático com, no mínimo, outras duas proteínas: tubulina e GAPDH (NISHMURA et al., 2004; OLIVEIRA; PEREIRA, 2009; TICOZZI et al., 2011).

VAPB atua durante o transporte e secreção no Retículo Endoplasmático (RE) e no Complexo de Golgi. É possível que a mutação P56S interrompa essa função conduzindo ao acúmulo de intermediários de transporte sob a forma de agregados membranosos citossólicos. Entretanto, a expressão da forma mutante de VAPB não altera a estrutura do RE e não se descarta a possibilidade de que alterações no sistema da membrana do Complexo de Golgi e RE estejam ocorrendo em células que expressam a forma alterada do VAPB. Assim, a proteína mutante do VAPB pode comprometer o transporte e secreção da membrana intracelular e levar a perda dos sinais tróficos ou a alteração de processos intracelulares resultando na morte do neurônio motor. É também possível que a VAPB esteja presente em estruturas distintas da membrana do RE e do Complexo de Golgi e que a mutação afete o acúmulo de proteínas nesses locais (NISHMURA et al., 2004).

A ELA8 foi subsequentemente descoberta por ser causada por essa única mutação. Hipóteses sugerem que a herança dominante da ELA8 é devida ao efeito negativo dominante da proteína mutante. A VAPB é expressa ubiquamente, ainda que a mutação P56S afete os neurônios motores. Esta vulnerabilidade seletiva também ocorre com a ELA1-SOD1, ELA2-Alsina e mutações no SETX. Talvez diferentes tipos de células não requeiram a mesma quantidade de VAPB para a sobrevivência, ou o VAPB pode ter outra função específica ainda

desconhecida nos neurônios. A mutação P56S pode interferir com a estabilidade do complexo de proteínas VAPB e uma insuficiência ou mecanismo de ganho de função poderia resultar na neurotoxicidade e, conseqüentemente, na morte do neurônio motor (NISHMURA et al., 2004).

As mutações no VAPB dominante conduzem para a agregação do VAMP dentro de aglomerados imóveis no retículo endoplasmático (RE), o que causa baixo nível da proteína, resultando em um retículo endoplasmático diminuído e com proteínas ancoradas contendo ligações lipídicas e na degeneração do neurônio motor. Após a inserção da proteína na membrana do retículo endoplasmático, a mutação P56S no gene *VAPB* causa o rápido agrupamento para gerar cisternas emparelhadas no RE, que dão origem a um domínio profundamente reestruturado e não agregado de proteínas citossólicas, o que seria o normal (CHEN et al., 2013; GENEVINI et al., 2014).

Além da perda do mecanismo de função, pelo sequestro de proteínas potencialmente funcionais em corpos de inclusão, evidências para um ganho de função tóxico do VAPB mutante também foram relatadas. Inclusões do VAPB mutante são ubiquitina positivas tanto em células transfectadas quanto em neurônios motores de animais transgênicos, e ambos os tipos selvagem e mutante quando superexpresso tem sido observado para diminuir a atividade do proteossoma. Esse fato sugere que as inclusões de VAPB podem alterar os proteossomas e atuam na alteração de vias de degradação de proteína, associado com um mecanismo patogênico importante pela toxicidade de agregados de proteínas mal formadas tanto na ELA esporádica quanto na familiar. Outro mecanismo envolvido é a inibição de transporte da mitocôndria afetando a regulação do motor anterógrado da cinesina (GENEVINI et al., 2014; OLIVEIRA; PEREIRA, 2009).

3.1.3 FUS E TARDBP:

FUS e TDP-43 são ligantes protéicos de DNA e RNA que modulam a regulação transcricional, o *splicing* do pré-RNA e o processo de microRNA. A TDP-43 é um aminoácido multifuncional pertencente a ribonucleoproteína heterogênea. A sua função específica é avaliada em vários processos biológicos incluindo a transcrição gênica, regulação do *splicing*, transporte e estabilização de moléculas de mRNA (FINELLI et al., 2015).

Usando uma abordagem experimental com combinação bioquímica e imunohistoquímica. A proteína *TAR DNA-binding protein 43* (TDP-43) foi identificada como

o principal componente de inclusões citoplasmáticas ubiquitinadas na ELA. A TDP-43 é hiperfosforilada e clivada para gerar fragmentos C-terminal anormais. Enquanto a TDP-43 está presente no núcleo celular em neurônios normais, ela é ausente nos núcleos dos neurônios com inclusões ubiquitinadas, sugerindo uma distribuição da proteína entre o núcleo e citoplasma. Existem algumas hipóteses do papel patogênico da TDP-43 na ELA, tais como, toxicidade por agregação da proteína longe da sua função nuclear normal, ou ocorrendo o contrário dos agregados de TDP-43 terem um ganho de função tóxico independente das atividades celulares fisiológicas da proteína. Mutações no gene *TARDBP*, o gene codificador da proteína TDP-43 foram encontradas na maioria dos casos da ELA Familiar em diferentes lugares (TICOZZI et al., 2011).

A identificação dessas mutações tem ligação com a predisposição genética para a ELA e para a presença de TDP-43 em agregados intracelulares em indivíduos já com ELA. A identificação das mutações na TDP-43 que resultam no aumento da fragmentação e toxicidade nos neurônios baseia-se no papel fisiopatológico para não acúmulo na ELA. Mutações como G294A, Q331K e M337V estão localizadas em uma região altamente conservada do C-terminal da TDP-43 e é conhecida por estar envolvida em interações entre as proteínas. A mutação Q331K em particular cria outra proteína quinase A local, resultando na fosforilação anormal. A mutação G294A tem um mecanismo que interfere na ligação de RNA e supressão de genes (KABASHI et al., 2008; SREEDHARAN et al., 2008).

Várias mutações no gene *TARDBP* tem sido descritas, todas caracterizadas pela substituição *missense* (sentido trocado), sendo que todas elas estão agrupadas na região C-terminal rica em glicina e codificada pelo éxon 6. Isso dificulta a possibilidade de se estabelecer a relação genótipo-fenótipo. A variante mais frequente, A382T, pode ser associada a uma doença predominantemente do neurônio motor inferior com um início assimétrico nos músculos distais dos membros, depois espalhando-se para os músculos proximais com considerável preservação dos músculos (TICOZZI et al., 2011).

O domínio C-terminal liga proteínas ribonucleares heterogêneas e inibe o *splicing* do mRNA condutor transmembrânico da fibrose cística. Na ELA o acúmulo de fragmentos de TDP-43 hiperfosforilados na soma do axônio é acompanhada pela perda de TDP-43 a partir do núcleo (SREEDHARAN et al., 2008).

O gene *FUS* está localizado no cromossomo 16p12.1-q21, que é o *locus* para a ELA6. Na maioria dos casos mostra predominância dos neurônios motores inferiores, sem envolvimento da região bulbar e sem prejuízo cognitivo. Mais de 50 mutações no gene *FUS*

foram identificadas em cerca de 4% dos casos da ELA Familiar. Análises histopatológicas dos casos *FUS* mutante esclarecem características de inclusões negativas da *TDP-43* e positivas da *FUS* e um começo da doença com idades precoces é notada em casos com citoplasma neuronal basofílico e compacto (CHEN et al., 2013).

A maioria dessas mutações são substituições *missense* (sentido trocado) e o resto são mutações *frameshift* (mudança na matriz de leitura) ou mutações *nonsense* (sem sentido), embora a correlação genótipo-fenótipo não seja possível para a maioria delas. Na proteína os últimos 18 resíduos da região C-terminal constituem o sinal de localização celular e a maioria das mutações identificadas estão agrupadas nessa região (TICOZZI et al., 2011).

O gene *FUS* abrange 9 kb de comprimento e compreende 15 éxons, codifica uma proteína de ligação DNA e RNA inicialmente isolada a partir da fusão de genes associados ao câncer em tumores mesenquimais malignos. A proteína *FUS* se localiza no núcleo da célula e está envolvida em várias vias celulares, tais como, a regulação da transcrição, manutenção da estabilidade do genoma, *splicing*, transporte entre núcleo e citoplasma e maturação de mRNA. No sistema nervoso central a *FUS* está envolvida na regulação do transporte de mRNA para os dendritos e plasticidade sináptica na ativação dos receptores de glutamato (TICOZZI et al., 2011).

Sendo o estresse oxidativo a característica principal da ELA, marcadores de estresse têm sido encontrados localizados com inclusões positivas de *FUS* e *TDP-43* no cordão espinhal de pacientes da ELA, sugerindo a associação do estresse oxidativo com inclusões patológicas da *FUS* e *TDP-43* tanto na ELA Familiar quanto na Esporádica. As mutações no gene *FUS* podem contribuir para a patogenia na ELA pela formação de inclusões citoplasmáticas e a perda das funções nucleares fisiológicas da proteína (FINELLI et al., 2015).

Segundo Finelli e colaboradores (2015) a disfunção mitocondrial também é relacionada a modelos celulares da ELA ligada a *FUS* e *TDP-43* mutantes. Ambos os alelos selvagem e mutante da *TDP-43* (ambos localizados nas mitocôndrias em leveduras e em células de mamíferos) e defeitos na estrutura e dinâmica mitocondrial são observados em células com superexpressão da *TDP-43* e mutação na ELA.

3.2 INVESTIGAÇÃO GENÉTICA

O objetivo da utilização de testes genéticos é a confirmação do diagnóstico da ELA, especialmente em casos nos quais as características sintomáticas são atípicas evitando-se, assim, uma busca inútil para outras causas de doenças dos sintomas (ANDERSEN, 2000).

Em uma pesquisa, após a extração de DNA genômico do sangue de indivíduos controles e afetados pela ELA, foram obtidos fragmentos de regiões internas do gene *SOD1* por meio da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* - Reação em cadeia da Polimerase) utilizando-se cinco conjuntos de iniciadores e, posteriormente sequenciamento. Para confirmar a presença da mutação foi usada a análise de RFLP (*Restriction-Fragment-Length Polymorphism* - Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição) utilizando-se os iniciadores 5'-CCAgAAAACACggTgggCAAACg-3' e 5'gCAAaggTgggggAAACACgg-3'. Os produtos do PCR foram digeridos com enzimas de restrição a 37 °C e os produtos de digestão separados e visualizados em gel de poliacrilamida a 12%. A presença da mutação heterozigótica foi confirmada pelo aparecimento de dois fragmentos de 143 pb e 123 pb no gel (SILVESTRE et al., 2002).

Outro estudo dessa vez para a detecção do sequenciamento do gene *VAPB* foi feito utilizando a técnica de PCR. O DNA genômico foi submetido a amplificação utilizando pela PCR com iniciadores específicos para o gene *VAPB*. Os produtos do PCR foram analisados por SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) e sequenciamento direto. Foram gerados dois modelos estruturais ao *VAPB* um normal e um mutante, e através de um marcador esperava-se uma ligação ao locus 20q13.3 previamente encontrado. Porém não houve essa interação. A triagem de mutação dos genes levou a identificação de uma substituição no gene *VAPB*, resultando em uma proteína alterada (*missense*) (NISHMURA et al., 2004).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, a descoberta de novos genes associados à Esclerose Lateral Amiotrófica foi significativa para o melhor entendimento do processo patológico dessa doença. Apesar do difícil diagnóstico, essa relação esclarece os mecanismos que levam a degeneração dos neurônios motores além de contribuir para o tratamento. A diferenciação das diversas mutações, exemplificadas para os genes abordados no artigo (*SOD1*, *VAPB*, *FUS* e

TARDBP), em função do *locus*, a herança genética, a alteração no organismo causada pela mutação, o processo patológico que leva a neurodegeneração, entre outros fatores, evidenciam a diversidade genética ligada a ELA.

A ELA Familiar apesar de abranger somente cerca de 10% dos casos da ELA, possui uma enorme relevância nos estudos dessa doença. Tendo uma causa genética, várias mutações já foram descritas, porém a dificuldade de se estabelecer uma etiologia característica para cada tipo ainda é uma preocupação. Além dos efeitos de cada mutação, em alguns pacientes foi diagnosticada a presença de mais de um gene mutante, gerando uma variabilidade do fenótipo.

Para a realização deste artigo, a maior dificuldade se concentrou na busca por trabalhos recentes que abordassem de forma mais ampla e definida a Esclerose Lateral Amiotrófica Familiar. Entretanto, há uma perspectiva para uma futura melhora em relação às informações referentes à ELA Familiar, por se tratar de um assunto de interesse do ponto de vista da área da saúde e pelas mais recentes pesquisas realizadas.

O desenvolvimento de pesquisas voltadas a ELA, não somente a sua forma Familiar e outras doenças neurodegenerativas traz uma esperança de um precoce diagnóstico e melhor tratamento para indivíduos e suas famílias que lidam com essa doença.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, P. Genetic factors in the early diagnosis of ALS. **Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders**, Londres, v. 1, n. suplemento1, p. s31-s42, mar. 2000.

CHEN, S. et al. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update. **Molecular neurodegeneration**, London, v. 8, n. 28, p. 1-15, ago. 2013.

FINELLI, M. Oxr1 improves pathogenic cellular features of ALS-associated FUS and TDP-43 mutations. **Human molecular genetics**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 3529-3544, jun. 2015.

GALVÃO, J. **Atualização do tratamento fisioterapêutico na esclerose lateral Amiotrófica – revisão de literatura**. 2013. 13 f. Monografia apresentado ao curso de Especialização em Fisioterapia Cardiopulmonar e Terapia Intensiva do Centro de Estudos Avançados e Formação Integrada, chancelado pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2013.

GENEVINI, P. et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis-Linked Mutant VAPB Inclusions Do Not Interfere with Protein Degradation Pathways or Intracellular Transport in a Cultured Cell Model. **PloS one**, São Francisco, v. 9, n. 11, p. 1-13, Nov. 2014.

JOHNSON, J. et al. Exome Sequencing Reveals VCP Mutations as a Cause of Familial ALS. **Neuron**, Cambridge, v. 68, n. 5, p. 857-864, dez. 2010.

KABASHI, E. et al. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. **Nature genetics**, Nova York, v. 40, n. 5, p. 572-574, mai. 2008.

KATO, S. et al. New consensus research on neuropathological aspects of familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase 1 (SOD1) gene mutations: Inclusions containing SOD1 in neurons and astrocytes. **Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders**, Londres, v. 1, n. 03, p. 163-184, jun. 2000.

MAGALHÃES, M.; ZATZ, M. Aspectos genéticos da Esclerose Lateral Amiotrófica. **Revista Neurociências**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 43-47, abr/jun. 2006.

NETO, M. Genética e Esclerose Lateral Amiotrófica. **Revista Neurociência**, São Paulo, v. 17, n. suplemento, p. 19-23, jun. 2009.

NISHIMURA, A. et al. A Mutation in the Vesicle-Trafficking Protein VAPB Causes Late-Onset Spinal Muscular Atrophy and Amyotrophic Lateral Sclerosis. **American Society of Humam Genetics**, São Paulo, v. 75, n. 5, p. 822-821, nov. 2014.

NORDON, D; ESPÓSITO, S. Atualização em esclerose lateral amiotrófica. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, São Paulo, v. 11, n. 2, p. 1-3, mar, 2009.

OLIVEIRA, A; PEREIRA, R. Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): three letters that Change the people's life. For ever. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, São Paulo, v. 67, n. 3A, p. 750-782, mai. 2009.

PALERMO, S. et al. Epidemiologia da esclerose lateral amiotrófica – Europa/América do Norte/América do Sul/Ásia: discrepância e similaridades: revisão sistemática da literatura / Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis – Europe. **Revista Brasileira de Neurologia**, São Paulo, v. 45 n. 2, p. 5-10, abr/jun. 2009.

QUADROS, A. História da Esclerose Lateral Amiotrófica no Brasil. **Revista Neurociências**, São Paulo, v. 14, n. 02, p. 14-23, abr/jun. 2006.

SACCON, R. et al. Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? **Brain: a journal of neurology**, London, v. 136, n. Pt8, p. 2342-2358, ago. 2013.

SILVA, H. Etiopatogenia da ELA: causa única ou várias causas? **Revista Neurociências**, São Paulo, v. 14, n. 02, p. 35-42, abr/jun. 2006.

SILVESTRE, T. et al. A novel exon 3 mutation (D76V) in the SOD1 gene associated with slowly progressive ALS. **Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders : official publication of the World Federation of Neurology, Research Group on Motor Neuron Diseases**, Londres, v. 3, n. 2, p. 69-74, jun. 2002.

SREEDHARAN, J. et al. TDP-43 Mutations in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Science**, Nova York, v. 319, n. 5870, p. 1668-1672, mar. 2008.

TICOZZI, N. et al. Genetics of familial amyotrophic lateral sclerosis. **Archives italiennes de biologie**, Pisa, v. 149, n. 1, p. 65-82, mar. 2011.

XEREZ, D. Reabilitação na Esclerose Lateral Amiotrófica: revisão da literatura / Rehabilitation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: literature review. **Acta Fisiátrica**, Rio de Janeiro, v. 15, n.3, p. 182-188, set. 2008.