

MUTAÇÕES NA PROTEÍNA VAPB E SUA RELAÇÃO COM A MORTE DE NEURÔNIOS MOTORES NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA

Autores: Evandro Lima, Israel Santos, Jefferson Reis, Jessica Nascimento, Juliana Silva, Thais Andrade

Universidade Cidade de São Paulo

Resumo

A ELA é doença crônica, progressiva e neurodegenerativa causada pela morte de neurônios motores. O diagnóstico destes pacientes pode levar até 12 meses para acontecer, sendo que estes vão à óbito entre 3 – 5 anos dos sintomas. Há, porém, grande variabilidade de quadros clínicos, com alguns pacientes falecendo com menos de 1 ano do início dos primeiros sinais, e outros que sobrevivem décadas. A identificação da ELA8, é causada por mutação missense no gene VAPB (Vesícula Associada a Proteína), tem contribuído significativamente com o conhecimento do mecanismo molecular por trás da ELA. A literatura recente tem evidenciado que a diminuição dos níveis de VAPB está presente em modelos celulares da doença, e também em amostras de pacientes, sugerindo que esta proteína teria papel central na doença e uma contribuição significativa para a morte dos neurônios motores.

Palavras-Chave: esclerose lateral amiotrófica, genes, mutação, vapb.

Abstract

ALS is a chronic, progressive, neurodegenerative disease caused by the death of motor neurons. These patients may take up to 12 months to diagnose, and they die within 3 to 5 years of symptoms. There is, however, great variability in clinical status, with some patients dying less than 1 year from the onset of the first signs, and others surviving decades. The identification of ALS8, caused by missense mutation in the VAPB (Protein Associated Vesicle) gene, has contributed significantly to the knowledge of the molecular mechanism behind ALS. Recent literature has shown that decreased VAPB levels are present in cellular models of the disease, as well as in patient samples, suggesting that this protein would play a central role in the disease and a significant contribution to motor neuron death.

Key-words: amyotrophic lateral sclerosis, genes, mutation, vapb

1 Introdução

A Esclerose múltipla Lateral Amiotrófica (ELA), é uma doença neurodegenerativa causada pela morte de neurônios motores superiores do córtex motor e inferiores do tronco cerebral e da medula espinal. As mortes desses neurônios causam à atrofia e fraqueza muscular, fasciculações e espasticidade. “Os pacientes frequentemente vivem de 3 a 5 anos após o início dos sintomas. Não há, em geral, qualquer comprometimento da consciência e da inteligência”(Abrela,2013).

Os primeiros sintomas da doença aparecem, normalmente, entre a 4ª e 6ª década de vida e compreendem o declínio de força, geralmente com assimetria lateral, acompanhado de câimbras, e fasciculações (contrações rápidas e involuntárias da musculatura). Achados clínicos com espasticidade e hiperreflexia são devidos à degeneração dos Neurônios Motores, enquanto a perda dos Neurônios Motores inferiores provoca fasciculações, atrofia e fraqueza muscular. A disfagia, dificuldade na deglutição e a disartria, dificuldade de fala, são causadas quando há comprometimento dos neurônios motores da região bulbar (Miguel Mitne Neto, 2011).

A degeneração provocada pela ELA é irreversível e em estágios avançados são afetados os quatros membros, musculatura facial, cervical e torácica. Nesta etapa, os Neurônios Motores apresentam-se com um quinto do diâmetro normal. O citoplasma e núcleo mostram-se extremamente condensados e o corpo celular adota formato fusiforme (Guégan & Przedborski 2003).

As manifestações clínicas são apresentadas em relação com seus sintomas iniciais: pacientes com início espinal da doença que correspondem a 70% dos casos, cujo sintomas iniciais se manifestam nos membros superiores ou inferiores. Pacientes com início bulbar que correspondem aproximadamente a 25% dos casos, e apresentam sintomas como disfagia (dificuldade de engolir, ou seja, fazer a deglutição de alimentos ou de líquidos) e disartria (é a dificuldade de articulação da fala causada por motivos neurológicos), dispneia e posteriormente sintomas nos membros. Pacientes com comprometimentos respiratórios como sintomas iniciais correspondem a 5% dos casos (Kiernan et al.,2011).

2 Problemática do ELA

Atualmente os estudos em busca de alterações genéticas estão evoluindo crescentemente para o entendimento da etiologia do ELA, que até hoje não se conhece uma causa fidedigna para a morte desses neurônios motores.

O único medicamento aprovado para o tratamento da doença é o riluzol, que atua em uma das vias do glutamato (Mitchell & Borasio 2007), como discutido adiante. Contudo, mostrou-se que seu efeito é limitado, estendendo a sobrevivência dos pacientes em apenas 2 – 4 meses (Bensimon et al., 1994, Miller et al., 2007).

A incidência mundial da ELA está estimada em 1,9 casos/100.000 indivíduos. (Chió et al., 2013). No Brasil a primeira iniciativa foi catalogar os pacientes no território nacional. Em 1998, por meio de pesquisa com médicos brasileiros, foram identificados 540 pacientes com ELA, sendo 58,5% do sexo masculino. Cerca de 5,9% dos pacientes tinham uma história familiar de outros casos de ELA. A média de idade de aparecimento dos primeiros sintomas foi de 52 anos, mais baixa que na Europa e nos Estados Unidos. Estima-se, em nosso meio uma incidência de 1,5 casos/100.000 pessoas, ou seja, 2.500 pacientes/ano (ABRELA, 2013).

3 Marco Teórico

A grande evolução em pesquisas genéticas em busca de uma elucidação para a Etiologia da Esclerose Múltipla lateral amiotrófica (ELA), vem trazendo resultados expressivos. Conforme o estudo genético da FAPESP publicado no American Journal of Human Genetics, em novembro de 2004, a proteína VAPB (Proteína B associada a vesícula) está envolvida com uma das variantes atípicas da doença, o ELA 8.

Pesquisadores encontraram alterações no gene que codifica a proteína VAPB em dezenas de indivíduos de sete famílias, todos portadores de uma dessas três doenças, e suspeitam hoje que uma deficiência na quantidade dessa proteína causa a morte de neurônios motores (FAPESP, 2004).

Outro trabalho mostrou que os níveis de VAPB estão diminuídos no sistema nervoso central de camundongos transgênicos portadores de mutação na sequência SOD1, principalmente nas fases avançadas da doença (TEULING ET AL., 2007).

As proteínas estão envolvidas com diferentes vias moleculares inclusive algumas ligadas a atividade de neurônios motores. Existem três formas de VAP em humanos: VAP-A, B e C. A VAPA é codificada por um gene no cromossomo 18 e possui 63% de identidade com a VAPB.

A VAPC é uma isoforma da VAPB gerada por splicing alternativo. As VAP são expressas de forma ubíqua e localizam-se em porções do retículo endoplasmático (RE) e intermediários entre o complexo de Golgi (CG) (SHEKEL ET AL., 2000).

O sistema Ubitiquina/Proteasoma é o principal responsável pelo controle de qualidade das proteínas nas células. Cadeias polipeptídicas malformadas, mesmo após a ação das Chaperonas no

RE, acabam sendo poli-ubiquitinadas e degradadas pelo 5 Proteasoma. Nos casos em que o sistema não consegue processá-las adequadamente (HUANG ET FIGUEREIDO, 2010). Com a mutação no domínio P56S a Proteína VAPB não consegue ser processada pelo sistema Ubiquitina-Proteassoma e ocorre o acúmulo destas cadeias podendo levar à apoptose do neurônio motor.

A morte desses neurônios motores está sendo relacionados a Esclerose Múltipla Lateral Amiotrófica (ELA), que é uma doença neurodegenerativa causada pela morte de neurônios motores superiores do córtex motor e inferiores do tronco cerebral e da medula espinal. As mortes desses neurônios causam à atrofia e fraqueza muscular, fasciculações e espasticidade. “Os pacientes frequentemente vivem de 3 a 5 anos após o início dos sintomas. Não há, em geral, qualquer comprometimento da consciência e da inteligência”. (ABRELA,2013).

4 Objetivo/justificativa

O Avanço nas pesquisas nos últimos anos referente a ELA, em busca de um marcador específico que possa ajudar no diagnóstico da doença como a proteína VAPB relacionada a ELA 8. E a busca pelos desenvolvimentos de novos tratamentos que possam ser mais eficazes no retardo dos sintomas dando maior chance de sobrevivência ao paciente, justificam o interesse de buscar artigos que evidenciam a interação da proteína com a fisiopatologia da doença.

O objetivo é comparar artigos que mostram de forma prática a diminuição da proteína VAPB e sua relação com a morte de neurônios motores e mostrar a importância desses estudos para novas elucidações e conhecimento da doença.

5 Material e Método

Este trabalho de conclusão de curso será realizado a partir de artigos e teses que serão pesquisados na plataforma PubMed e Google acadêmico buscando fazer uma revisão literária investigando possíveis comprovações sobre a diminuição dessa proteína com o desenvolvimento e agravamento da ELA.

Os artigos foram selecionados de acordo com sua objetividade e enfoque na parte genética envolvendo as mutações nas regiões codificadoras da proteína, na parte fisiopatológica da doença e artigos que mostram na prática experiências com animais ou humanos que confirmem de fato essas alterações, que mostrem técnicas de PCR (Reação Em Cadeia Da Polimerase), Eletroforese entre outros.

6 Discussão

Atualmente foram descritos cerca de 58 genes relacionados à ELA (segundo dados revisados de Marangi et.al 2014) destes 58 relacionados 32 são considerados genes “principais” ou “causadores”; sendo que 7 foram relacionados como alteradores de fenótipo e 19 genes foram relacionados como genes de susceptibilidade. (MELINDA BECCARI, 2015).

As vias em que os genes causadores atuam são distintas, umas estão relacionadas com o processamento de RNAm, Stress oxidativo, tráfego de endossomos e sinalização celular (VAPB, vias de degradação proteica E remodelamento de cromatina. A figura abaixo demonstra as vias de alteração e os genes associados a patofisiológica de ELA.

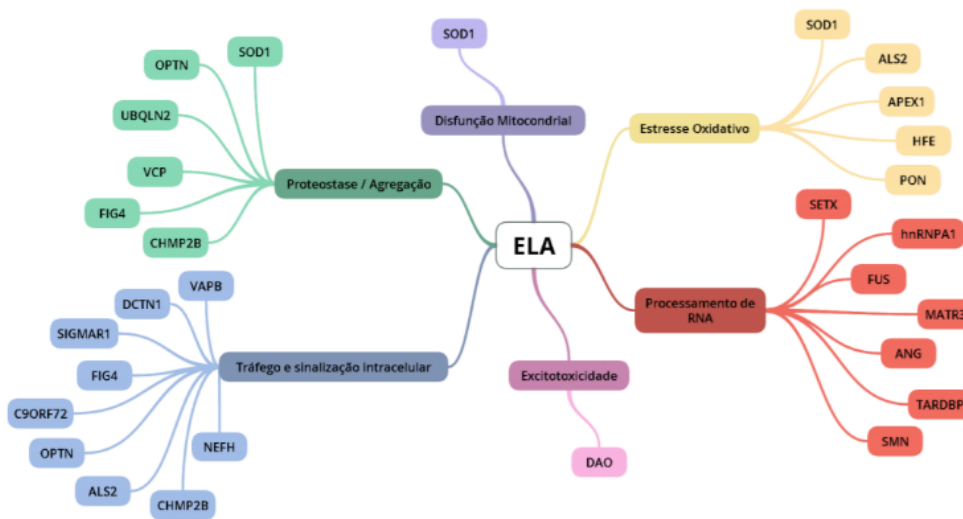


Figura 1. Mecanismo moleculares associados à patofisiologia de ELA (adaptado de COATTI et al..2015)

7 VAPB

A VAPB é composta por 3 domínios o Major Sperm Protein o MSP é composto pelos primeiros 150 aminoácidos e é nele que se encontra a mutação p56s (Nishimura et.al 2004). As proteínas VAP São expressas de forma Ubíqua e localizam-se entre a região do Reticulo endoplasmático e complexo de golgi (shekel et.al 2000) elas estão envolvidas com diversas vias moleculares e algumas relacionadas diretamente as atividades dos neurônios motores. A Proteína VAPB possui 16 aminoácidos de alto grau de conservação em seu domínio MSP (Lev et al.2008).

As proteínas da Classe VAP estão envolvidas com o tráfego e sinalização intracelular, organização de microtúbulos, homeostase do cálcio, metabolismo de Lipídeos, proliferação tumoral.

Amarílico et al.2005 descreveu que a VAPB tem um papel importante na estabilização de organelas pelos microtúbulos. O Autor observou a VAPB como um ligante entre RE e o citoesqueleto em alguns tipos celulares, a VAPB também interage com uma proteína mitocondrial a PTPIP51 que forma uma ligação entre RE e a Mitocôndria que ajuda na regulação do Ca^{2+} em alguns tipos celulares (De Vos et al.2012).

8 VAPB E ELA 8

Inicialmente o trabalho de Teuling e colaboradores apresentaram que os níveis da proteína VAPB estão diminuídos em pacientes com ELA esporádica e no sistema nervoso central de camundongos transgênicos portadores da mutação do gene SOD1G93A, principalmente nas fases mais avançadas da doença (Teuling et al., 2007).

Em 2004 Nishimura e colaboradores identificaram uma mutação no Gene VAPB como sendo responsável pela forma de ELA8. A ELA8 apresenta herança autossômica dominante, caracterizada por uma progressão lenta, fasciculações câimbras e tremores posturais. Desde sua primeira descrição, mais de 127 pacientes foram diagnosticados com ELA8 no Centro de Pesquisa de Genoma Humano e Células Tronco, correspondendo quase 50% dos casos de ELA. Outros pacientes diagnosticados com ELA8 foram encontrados em outros países, como Japão (Millecamps et al.,2010), Alemanha (Funke et al., 2010) e Reino Unido que possuem haplótipos distintos das famílias brasileiras, sugerindo origens distintas da doença.

Os estudos iniciais utilizando modelos de superexpressão evidenciaram o acúmulo da proteína VAPB no Retículo Endoplasmático e estas inclusões capturam também a proteína VAPA e VAPB selvagens. Inclusões endoplasmáticas são marcas típicas de doenças neurodegenerativas.

Porém, foi analisado em modelos murinos de superexpressão da VAPB selvagem e mutada não apresentaram fenótipo algum de degeneração dos neurônios motores (Qiu et al., 2013). Porém o que deve ser analisado é que foi analisado que a expressão da VAPB está diminuída na medula espinhal de pacientes esporádicos e em modelos murinos mutantes para SOD1, isto indica que a diminuição dos níveis desta proteína seria de carácter comum associado a degeneração dos neurônios motores (Teuling et al.,2007).

9 Resultados

Estes levantamentos de dados analisados de acordo com os artigos sugerem que o acometimento desta doença está relacionado a redução, e não no acúmulo dos níveis da proteína VAPB (Tudor et.al,2010).

Em 2008 através da técnica de PCR em Tempo Real, Anagnostou e colaboradores analisaram a expressão de 11 genes associados à ELA. Observaram que estavam reduzidos de maneira significativa os transcritos correspondentes à VAPB na medula espinhal de pacientes com ELA esporádica, sendo que esta diminuição é mais marcante em pacientes de rápida progressão da doença. (Anagnostou et al., 2008)

Em 2011 o trabalho de Mitne-Neto e colaboradores realizados em neurônios motores derivados de célula tronco pluripotentes de um paciente com ELA8, geradas a partir de fibroblastos do próprio paciente, mostrou que: (1) há a diminuição de VAPB nos extratos celulares de pacientes com ELA8; e (2) há uma falha no aumento de expressão de VAPB ao longo do processo de diferenciação das iPSCs em neurônios motores. Acredita-se que os pacientes de ELA8 apresentariam quantidades reduzidas de VAPB ao longo de seu desenvolvimento, tornando crítica a sobrevivência dos neurônios motores a partir da 4 ou 5 décadas de vida, do início dos sintomas (Mitne-Neto et al 2011).

Em 2013 Deidda e colaboradores, através de western Blots analisando leucócitos de sangue periférico e líquido cefalorraquidiano visando avaliar os níveis de VAPB em pacientes esporádicos. Foi constatado que em pacientes de ELA de início bulbar a banda correspondente ao MSP estava significativamente reduzida ou (ausente) no líquido cefalorraquidiano destes pacientes. Esta diminuição pode estar associada a rápida progressão da doença. Faz-se necessário uma avaliação mais robusta dos níveis de VAPB.

Há artigos que mostram que não só a haploinsuficiência da VAPB é causadora de ELA8 Teulling et al.2007 mostra que pode haver uma mutação na proteína VAPB que pode explicar efeitos tóxicos adicionais. A VAPB mutada pode formar agregados citosólicos que não colocalizam com marcadores do Reticulo Endoplasmático podendo levar o neurônio a apoptose.

10 Conclusão

A partir dos dados analisados em artigos conclui-se que os distúrbios dos níveis da proteína VAPB, que apesar de ser expressa em todos os tecidos do nosso corpo a mutação só compromete apenas o tecido nervoso. Os dados mostram que a VAPB não está reduzida somente em pacientes de ELA8, mas também em outras formas da doença.

Apesar da maioria dos artigos seguirem a mesma hipótese de que a redução de VAPB

levaria a uma menor disponibilidade na célula, gerando como consequência a excitotoxicidade nos Neurônios motores, há artigos que trazem como discussão outras hipóteses em que a mutação da VAPB não causaria a excitotoxicidade, porém a proteína por estar mutada estaria inativa deixando de fazer seu papel fisiológico no neurônio motor.

Apesar de a cada dia surgirem novas hipóteses, esses trabalhos contribuem para o avanço na busca de diagnóstico e tratamentos mais eficazes, como para desenvolvimentos de novos fármacos para evitar a progressão da doença.

11 Referência bibliográfica

ABRELA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ESCLERO LATERAL AMIOTRÓFICA, 1999. Disponível em: <www.abrela.org.br/wp-content/uploads/2018/05/AbrELA_LIVRETO_web.pdf>. Acesso em: 02 Abril 2019.

MITNE NETO, M. Teses e Dissertações, 2011. Disponível em: <<http://cepid.fapesp.br/home/http://cepid.fapesp.br/materia/84>>. Acesso em: 16 Abril 2019.

PAILLUSSON, S.; SUAGA, P. G.; STOICA, R. Link Springer. Springer Link, 23 Março 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00401-017-1704-z>>. Acesso em: 17 Abril 2019.

PALMA, F. R. Biblioteca Digital USP. Teses e Dissertações, 2016. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41131/tde-03012017-145226/pt-br.php>>. Acesso em: 04 Setembro 2019.

SANTOS BECCARI, M. Teses e Dissertação. Teses USP, 2015. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41131/tde-18012016-155440/publico/Melinda_Beccari.pdf>. Acesso em: 17 Agosto 2019.

TEULING, E. et al. PubMed. US National Library of Medicine National Institutes of Health., 05 setembro 2007. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/content/27/36/9801.long>>. Acesso em: 16 abril 2019.