



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**VARIANTES POLIMÓRFICAS EM GENES DE DETOXIFICAÇÃO CELULAR E
SUAS RELAÇÕES COM O DESENVOLVIMENTO DA ESCLEROSE LATERAL
AMIOTRÓFICA**

KAMILLA DE FARIA SANTOS

GOIÂNIA-GO

2020

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das dissertações e teses disponibilizados são de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o autor e o orientador firmam o compromisso de que ele não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: KAMILLA DE FARIA SANTOS

Título do trabalho: VARIANTES POLIMÓRFICAS EM GENES DE DETOXIFICAÇÃO CELULAR E SUAS RELAÇÕES COM O DESENVOLVIMENTO DA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA


3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Independente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 25 / 03 / 2020

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento, imagens coladas não serão aceitas.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: *Kamille de Faria Santos*

Título do trabalho: *variantes polimórficas em genes de detoxificação celular e suas relações com o desenvolvimento da Escherichia Coliforme*

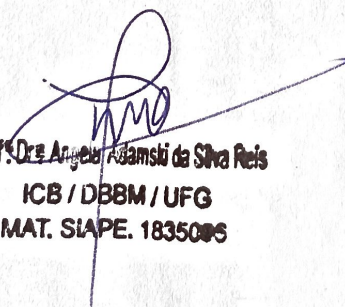
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Kamille de Faria Santos
Assinatura do (a) autor (a) ²

Data: 05 / 12 / 2022


Prof.ª Dr.ª Angela Adamski da Silva Reis
ICB / DBBM / UFG
MAT. SIAPE. 1835005

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

²A assinatura deve ser escaneada.

KAMILLA DE FARIA SANTOS

**VARIANTES POLIMÓRFICAS EM GENES DE DETOXIFICAÇÃO CELULAR E
SUAS RELAÇÕES COM O DESENVOLVIMENTO DA ESCLEROSE LATERAL
AMIOTRÓFICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof. Dra. Angela Adamski da Silva Reis

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo da Silva Santos

GOIÂNIA-GO

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Santos, Kamilla de Faria

Variantes polimórficas em genes de detoxificação celular e suas relações com o desenvolvimento da Esclerose Lateral Amiotrófica [manuscrito] / Kamilla de Faria Santos. - 2020.

93 f.: il.

Orientador: Prof. Dra. Angela Adamski da Silva Reis; co-orientador Dr. Rodrigo da Silva Santos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Goiânia, 2020.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. ELA. 2. Polimorfismo genético. 3. Glutathione S-transferase. 4. GSTM1. 5. GSTT1. I. Reis, Dra. Angela Adamski da Silva, orient. II. Título.

CDU 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 081 da sessão de Defesa de Dissertação de **KAMILLA DE FARIA SANTOS**, que confere o título de Mestre(a) em **GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**, na área de concentração em **Genômica Estrutural, Funcional e Proteômica**.

Ao/s cinco dias do mês de março de dois mil e vinte, a partir da(s) 9 horas, no(a) **Auditório do Instituto de Química 2**, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada **“O PAPEL DE VARIANTES POLIMÓRFICAS EM GENES DE DETOXIFICAÇÃO CELULAR E SUAS RELAÇÕES COM O DESENVOLVIMENTO DA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA”**. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), Professor(a) Doutor(a) **Angela Adamski da Silva (ICB/UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor(a) Doutor(a) **Guilherme Rocha Lino de Souza (ICB/UFG)**, membro titular externo; Professor(a) Doutor(a) **Alexandre Melo Bailão (ICB/UFG)**, membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestão de alteração do título do trabalho, conforme explicitado abaixo. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo(a) Professor(a) Doutor(a) **Angela Adamski da Silva**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao(s) cinco dias do mês de março de dois mil e vinte.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

VARIANTES POLIMÓRFICAS EM GENES DE DETOXIFICAÇÃO CELULAR E SUAS RELAÇÕES COM O DESENVOLVIMENTO DA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA



Documento assinado eletronicamente por **Angela Adamski Da Silva Reis, Professor do Magistério Superior**, em 05/03/2020, às 10:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Melo Bailao, Professor do Magistério Superior**, em 05/03/2020, às 10:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Rocha Lino De Souza, Professor do Magistério Superior**, em 05/03/2020, às 11:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1203584 e o código CRC 99D92917.

06/03/2020

SEI/UFMG - 1203584 - Ata de Defesa de Dissertação

Referência: Processo nº 23070.004963/2020-14

SEI nº 1203584

TRABALHO REALIZADO NO LABORATÓRIO DE PATOLOGIA MOLECULAR, DO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, DO INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS II DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS.

APOIO FINANCEIRO: CAPES/UFG.

KAMILLA DE FARIA SANTOS

**VARIANTES POLIMÓRFICAS EM GENES DE DETOXIFICAÇÃO CELULAR E
SUAS RELAÇÕES COM O DESENVOLVIMENTO DA ESCLEROSE LATERAL
AMIOTRÓFICA**

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Angela Adamski da Silva Reis
Universidade Federal de Goiás

Prof^o Dr^o Guilherme Rocha Lino de Souza
Universidade Federal de Goiás

Prof^o Dr^o Alexandre Melo Bailão
Universidade Federal de Goiás

*Dedico esse trabalho a todos os portadores de
Esclerose Lateral Amiotrófica.*

*“Por mais difícil que a vida possa parecer,
sempre há algo que você pode fazer, e ter
sucesso. É importante que você não desista.”*

-Stephen Hawking

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por permitir que eu realizasse esse sonho da maneira que idealizei, por me sustentar até aqui apesar de todos os percalços que passei e por colocar em minhas mãos um trabalho tão lindo e enriquecedor.

Agradeço a minha família, a todos que mesmo não sabendo o que eu faço me apoiaram e torceram pelo meu sucesso. Em especial, agradeço a minha mãe Marilena de Faria Santos, meu pai Gênis Rosa dos Santos e ao meu irmão João Vitor de Faria Santos, pelo apoio financeiro e emocional, por fazerem de mim a pessoa que sou e, principalmente, por sempre acreditarem em mim, mesmo quando eu mesma não acredito. Sem vocês nada disso seria possível, não tenho palavras para dizer o quanto amo vocês!

Aos meus orientadores, Dra. Angela Adamski da Silva Reis e Dr. Rodrigo da Silva Santos, por acreditarem em mim e no meu potencial. Pela troca de conhecimentos, experiências, oportunidades dadas, o apoio nos momentos mais difíceis, pela paciência e pela amizade. Sempre levarei o que aprendi com vocês, e mesmo se não acreditarem, eu gosto muito de vocês!

Aos meus amigos de longa data, Elisson Luiz, Lidya Moraes, Apolo Wilker, Patrícia Carvalho e Nayara Machado, que sempre me apoiaram e que nunca desistiram de mim. Agradeço por entenderem minha ausência e por acreditar e demonstrar que essa amizade/irmandade nunca mudou ou mudará. Agradeço também aqueles amigos que por algum motivo não estão mais presentes no meu cotidiano, mas que apoiaram e acreditaram no meu sucesso.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Patologia Molecular (LPM), as minhas gêmeas Rayana Pereira e Jéssica Barletto, a Caroline Christine, Nayane Lima, Ana Carolina, Rômulo Moraes, Jullia Costa e todos que fazem parte dessa família, agradeço pelo companheirismo, apoio e incentivo, pelo otimismo, por me fazerem sentir em casa, mesmo longe de Itapuranga, pelas broncas, choros, risadas, choros seguidos de risadas, pelas noites acordados (seja por qualquer motivo), pela paciência e por tornarem minha vida mais leve. Cada um de vocês sabe o que representa na minha vida, tanto acadêmica quanto pessoal, guardarei sempre o que aprendi com vocês. Obrigada!

À Direção e aos funcionários do Centro de Reabilitação e Readaptação Dr. Henrique Santillo (CRER), que nos acolheram e apoiaram o nosso trabalho.

Aos pacientes e seus familiares pela colaboração, sem eles não seria possível a concretização desse trabalho. Sei que muitos já se foram, mas espero que o nosso trabalho e dedicação tenham, de alguma forma, acalentado o coração deles. Estarei sempre pensando e lutando por vocês!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Mestrado e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular (PGBM) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Agradeço a banca avaliadora por aceitarem o meu convite e pela disponibilidade em avaliar e contribuir com o enriquecimento desse trabalho.

E agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho e desse sonho, muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Regiões do sistema nervoso afetadas pela ELA.....17
- Figura 2.** Mecanismos patológicos e polimorfismos genéticos relacionados ao desenvolvimento da ELA.....21
- Figura 3.** Formação de espécies reativas de oxigênio e principais enzimas antioxidantes atuantes.....24
- Figura 4.** Representação esquemática das fases do processo de detoxificação celular, com ênfase na fase II.....28
- Figura 5.** Curva de *melting* produzida na qPCR multiplex. Os picos correspondem aos genótipos presente de *RH92600* (83°C), *GSTM1* (87°C) e *GSTT1* (89°C)..... 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização demográfica e comparação dos grupos caso e controle.....	38
Tabela 2. Distribuição das frequências genótípicas de <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> e suas possíveis combinações na análise de risco para o desenvolvimento de ELA.....	40
Tabela 3. Associação dos genótipos nulo e presente de <i>GSTM1</i> ao perfil demográfico e clínico de pacientes com ELA.....	42
Tabela 4. Associação dos genótipos <i>GSTT1</i> nulo e presente ao perfil demográfico e clínico de pacientes com ELA.....	43
Tabela 5. Associação das possíveis combinações genótípicas ao perfil demográfico e clínico de pacientes com ELA.....	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- % - Do latim, *per centum*, unidade de medida dada em porcentagem
- AMPA-R: Receptor ionotrópico de glutamato
- BHE - Barreira hematoencefálica
- C21orf2*: Cromossomo 21 quadro de leitura aberto 2
- C9ORF72* - Cromossomo 9 quadro de leitura aberto 72
- Ca²⁺ - Cálcio
- CAT - Catalase
- Cu⁺ - Cobre
- DNA - Ácido Desoxirribonucleico (Do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*)
- EAAT2: Transportador de aminoácido excitatório 2
- ELA - Esclerose Lateral Amiotrófica
- ERNs - Espécies reativas de nitrogênio
- EROs - Espécies reativas de oxigênio
- FDA - *Food and Drug Administration*
- Fe²⁺ - Ferro
- FUS - Proteína de ligação ao RNA
- GPx - Glutathione peroxidase
- GSH - Glutathione reduzida
- GSSG - Glutathione dissulfeto
- GST - Glutathione S-transferase
- GSTM1* - Glutathione S-transferase isoforma Mu 1
- GSTT1* - Glutathione S-transferase isoforma Theta 1
- H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
- HO[•] - Radical hidroxila
- kDa - Unidade de massa atômica, quilodalton
- NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato em sua forma reduzida
- NEK1*: Gene A da quinase 1 relacionada ao NIMA
- NMI - Neurônio motor inferior
- NMS - Neurônio motor superior
- nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal
- NO - Óxido nítrico

O₂ - Oxigênio molecular

O₂⁻ - Radical superóxido

ONOO⁻ - Peroxinitrito

PCR - Reação em cadeia da polimerase

Q⁻ - Ubiquinona parcialmente reduzida

qPCR - PCR em tempo real

RBP: Proteína de ligação à RNA

RNA - Ácido Ribonucleico (Do inglês, *Ribonucleic Acid*)

SNC - Sistema nervoso central

SNPs - Polimorfismos de nucleotídeo único (Do inglês, *Single-Nucleotide Polymorphisms*)

SOD Cu/Zn - Superóxido dismutase cobre/zinco

TARDBP - proteína de ligação ao DNA TDP-43

VAPB - Proteína de membrana associada à vesícula B

A - Alpha

ζ - Zeta

θ - Theta

μ - Mu

π - Pi

σ - Sigma

ω - Omega

SUMÁRIO

RESUMO.....	14
ABSTRACT	15
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1. Esclerose Lateral Amiotrófica	16
1.2. Estresse Oxidativo como fator neurodegenerativo	22
1.3. Sistema Glutathiona S-transferase	27
1.4. Polimorfismos de deleção dos genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> e sua possível associação com a ELA	30
2. OBJETIVOS.....	33
2.1. Objetivo geral	33
2.2. Objetivos específicos	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Declaração de ética	34
3.2. População de estudo.....	34
3.3. Análises genéticas.....	35
3.4. Análise estatística	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1. Caracterização da população de estudo	37
4.2. Distribuição genotípica e a relação das deleções de <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> com o desenvolvimento da ELA e variáveis clínicas e demográficas.....	40
5. CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXOS	57

RESUMO

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa causada pela degeneração dos neurônios motores, acarretando em atrofia muscular progressiva. Estudos sugerem a relação da doença com fatores ambientais e genéticos, e o envolvimento de mecanismos, como o estresse oxidativo, com a degeneração neuronal. No entanto, o organismo possui diversas maneiras de promover a detoxificação celular contra compostos nocivos. A família Glutationa S-transferase (GST) consiste em enzimas multifuncionais que atuam na detoxificação celular e eliminação de diversas substâncias, incluindo os produtos de estresse oxidativo. Dentre as classes citosólicas humanas da família GST, destacam-se duas isoenzimas: *GSTM1* e *GSTT1*, ambas codificadas por genes de mesmo nome, esses genes possuem um polimorfismo de deleção total que acarreta na ausência de atividade enzimática. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os polimorfismos de deleção nos genes *GSTM1* e *GSTT1* e a associação destes com o risco de desenvolvimento da ELA. Realizou-se um estudo caso-controle que incluiu 101 pacientes diagnosticados com ELA e 119 indivíduos sem diagnóstico de doenças neurodegenerativas. Amostras de sangue periférico foram coletadas de ambos os grupos e submetidas à extração de DNA e posterior genotipagem. Os polimorfismos foram genotipados pela técnica de PCR em tempo real (qPCR) multiplex, com a definição dos genótipos nulo e presente pelas análises das curvas de *melting* produzidas após a amplificação. Dados clínicos e demográficos foram coletados a partir de prontuários médicos e questionários, incluindo tópicos como tabagismo, etilismo, idade do diagnóstico, prática de atividade física, histórico ocupacional, dentre outros. Entre os grupos analisados o consumo de álcool foi predominante nos pacientes portadores de ELA, notando-se uma diferença significativa entre os grupos caso e controle ($p=0,01$). No entanto, não houve associação dos polimorfismos de deleção *GSTM1* ($p=0,85$), *GSTT1* ($p=0,90$) e suas possíveis combinações genotípicas com o risco no desenvolvimento de ELA. A relação dos polimorfismos com o perfil clínico e demográfico dos pacientes com a doença também foi realizado. Nessa análise, houve diferença significativa do genótipo *GSTM1*-presente com as variáveis: exposição ambiental e tabagismo ($p=0,02$ e $0,03$, respectivamente), do genótipo *GSTT1*-presente com o histórico de doença neurodegenerativa na família ($p=0,01$), enquanto o genótipo duplo presente também apresentou diferença significativa com o histórico de doença neurodegenerativa na família ($p=0,02$). Nesse contexto, os resultados encontrados nesse estudo demonstram a não associação dos polimorfismos de deleção de *GSTM1* e *GSTT1* com o desenvolvimento da ELA.

Palavras-chave: ELA; Polimorfismo genético; Glutationa S-transferase; *GSTM1*; *GSTT1*.

ABSTRACT

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease caused by the degeneration of motor neurons, leading to progressive muscular atrophy. Studies suggest the relationship of the disease with environmental and genetic factors, and the involvement of mechanisms, such as oxidative stress, with neuronal degeneration. However, the body has several ways to promote cellular detoxification against harmful compounds. The Glutathione S-transferase (GST) family consists of multifunctional enzymes that act on cell detoxification and elimination of various substances, including oxidative stress products. Among the human cytosolic classes of the GST family, two isoenzymes are highlighted: *GSTM1* and *GSTT1*, both encoded by genes of the same name, these genes have a total deletion polymorphism that results in the absence of enzymatic activity. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the deletion polymorphisms in *GSTM1* and *GSTT1* genes and their association with the risk of developing ALS. A case-control study was conducted, including 101 patients diagnosed with ALS and 119 individuals without diagnosis of neurodegenerative diseases. Peripheral blood samples were collected from both groups and subjected to DNA extraction and subsequent genotyping. The polymorphisms were genotyped by the multiplex real - time PCR (qPCR) technique, with the definition of the null and present genotypes by analysis of the melting curves produced after the amplification. Clinical and demographic data were collected from medical records and questionnaires, including topics such as cigarette use, alcohol intake, age of diagnosis, physical activity practice, occupational history, among others. Among the groups analyzed, alcohol consumption was predominant in patients with ALS, with a significant difference between the case and control groups ($p=0.01$). However, there was no association of *GSTM1* ($p=0.85$), *GSTT1* ($p=0.90$) deletion polymorphisms and their possible genotypic combinations with the risk of developing ALS. The relationship of polymorphisms with the clinical and demographic profile of patients with the disease was also performed. In this analysis, there was a significant difference in the *GSTM1-present* genotype with the variables: environmental exposure and smoking ($p = 0.02$ and 0.03 , respectively), in the *GSTT1-present* genotype with a history of neurodegenerative disease in the family ($p=0.01$), while the double genotype present also showed a significant difference with the family history of neurodegenerative disease ($p=0.02$). In this context, the results found in this study demonstrate the non-association of *GSTM1* and *GSTT1* deletion polymorphisms with the development of ALS.

Keywords: ALS; Genetic polymorphism; Glutathione S-transferase; *GSTM1*; *GSTT1*.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Esclerose Lateral Amiotrófica

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) foi primeiramente descrita pelo neurologista francês Jean-Martin Charcot, em 1869, por consequência, na França a doença é conhecida como “Mal de Charcot”. Nos Estados Unidos, ganhou repercussão e ficou conhecida como “Doença de Lou Gehring”, nome do famoso jogador de beisebol que faleceu em decorrência da doença no ano de 1941. No Brasil, a primeira descrição da doença ocorreu em 1909, pelo Dr. Cypriano Freitas (ABRELA, 2013; PRADO et al., 2016). A definição da doença está intrínseca a sua própria designação, sendo o termo Esclerose definido como atrofia e cicatrização; Lateral refere-se à atrofia da porção lateral da medula espinhal; e Amiotrófica remete a atrofia muscular (ABRELA, 2013).

Assim, a ELA é considerada uma doença neurodegenerativa progressiva, grave e rara, caracterizada pela degeneração dos neurônios motores superiores e inferiores (NMS e NMI), afetando vários níveis: bulbar, cervical, torácico e lombar (Figura 1). Como resultado, tem-se uma paralisia muscular progressiva que compromete a capacidade funcional do indivíduo (CHIO et al., 2013; ESCARRABILL et al., 2014; HARDIMAN et al., 2017). Geralmente, em indivíduos acometidos pela doença, há um declínio da atividade muscular com início nas extremidades, avançando a posteriori, para o restante do corpo (ESCARRABILL et al., 2014).

A degeneração dos NMS no cérebro gera sintomas que incluem espasticidade, hiperreflexia, labilidade emocional e limitações funcionais. Enquanto a perda de NMI acarreta em sinais como fraqueza muscular, perda de peso, câibras e fasciculações, bem como o comprometimento a nível bulbar, cujas manifestações disartria, disfagia, disfonia, e comprometimento respiratório também são relatadas (ABRELA, 2013; OSKARSSON; GENDRON; STAFF, 2018).

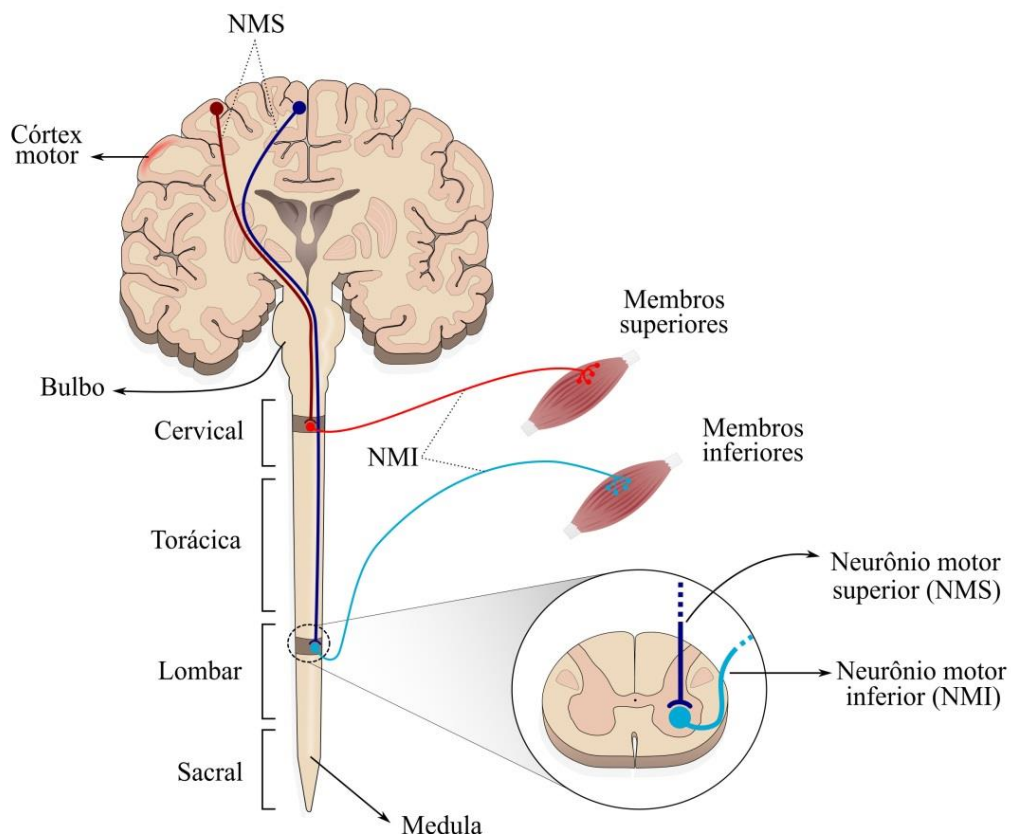


Figura 1. Regiões do sistema nervoso afetadas pela ELA.

Usualmente, as funções autônomas, como a função cardíaca e esfínteriana, pressão, temperatura e o sistema sensorial, são preservadas (BROOKS et al., 2000; SWINNEN; ROBBERECHT, 2014; OSKARSSON; GENDRON; STAFF, 2018). Entretanto, quadros de demência, alterações cognitivas e disfunção executiva foram associados e descritos em mais de 50% dos pacientes portadores da doença (WANG et al., 2017).

Mundialmente, as taxas de incidência e prevalência da ELA são variáveis, oscilam de 1,55-1,96 casos/100.000 pessoas/ano e 1,0-11,3 casos/100.000 pessoas, respectivamente (CHIO et al., 2013; MARIN et al., 2017). Atualmente, relata-se a existência de aproximadamente 450.000 portadores de ELA no mundo (GROLLEMUND et al., 2019), com projeções para aumento de até 70% de casos nas próximas duas décadas (CHIA; CHIÒ; TRAYNOR, 2018; ZENG; ZHOU, 2019).

Apesar dos estudos epidemiológicos reportarem uma frequência similar de ELA em vários países, a maioria dessas pesquisas provém da América do Norte e da Europa, evidenciando a importância e relevância em buscar informações oriundas de outros

continentes. Aprimorando assim, o conhecimento sobre a distribuição e os possíveis fatores determinantes da ELA (CHIO et al., 2013; TALBOTT; MALEK; LACOMIS, 2016).

No Brasil, o quinto maior país por área geográfica e população, há poucos estudos clínico-epidemiológicos sobre a doença (MORAES et al., 1998; DIETRICH-NETO et al., 2000; LIMA; NUCCI, 2011; MATOS et al., 2011; LINDEN-JUNIOR et al., 2013; PRADO et al., 2016). Com base nesses estudos, a taxa de incidência e prevalência da ELA no Brasil foi estipulada em torno de 0,4 casos/100.000 pessoas/ano e 0,9-1,5 casos/100.000 pessoas, respectivamente (DIETRICH-NETO et al., 2000; PRADO et al., 2016). Entretanto, devido às diferenças socioeconômicas e étnicas dentro do país, permanece incerta a confiabilidade dos dados desses estudos em representar o perfil clínico de pacientes com ELA de todas as regiões brasileiras (PRADO et al., 2016).

Supõe-se que diversos fatores possam estar relacionados ao desenvolvimento da ELA, entretanto, até os dias atuais, estabeleceu-se principalmente a idade avançada, o sexo masculino e o histórico familiar da doença (INGRE et al., 2015). Dados revelam um aumento na incidência da doença após os 40 anos, com pico entre 60 e 75 e posterior declínio, apesar de, aproximadamente, 4 a 6% dos casos de ELA serem relatados em indivíduos com idade inferior a 40 anos (ABRELA, 2013; HARDIMAN et al., 2017).

Verifica-se ainda, o predomínio da doença nos homens em uma proporção 1,5:1, e principalmente em brancos, quando comparado a outras etnias (ABRELA, 2013; HARDIMAN et al., 2017). O maior acometimento de homens pode refletir o predomínio do sexo masculino em profissões com maior exposição a fatores de risco (produtos químicos, descargas elétricas, entre outros), bem como a uma possível proteção hormonal feminina (POLLARI et al., 2014; MOURA; CASULARI; CARVALHO GARBI NOVAES, 2016; HARDIMAN et al., 2017; ROONEY et al., 2017).

Quanto à etnia, a menor frequência de negros portadores de ELA pode ser explicada por fatores genéticos diferenciais nesse grupo, que podem atuar como fator de proteção contra a doença. Contudo, deve-se considerar ainda, a relação dessa frequência com as diferenças no acesso a serviços de saúde e no status socioeconômico entre grupos étnicos (RECHTMAN et al., 2015; ROBERTS et al., 2016; LOGROSCINO; PICCININI, 2019; LUNA et al., 2019).

Em sua maioria, quanto à etiologia, os casos de ELA são classificados como esporádicos (90%), enquanto cerca de 10% dos casos são ditos como familiar, apresentando padrão de herança autossômica dominante. Ambos possuem fenótipos patológicos e clínicos

semelhantes, que demonstram um mecanismo implícito similar de degeneração na progressão da doença (HARDIMAN et al., 2017; OSKARSSON; GENDRON; STAFF, 2018).

Em relação aos sinais clínicos iniciais, a ELA pode ainda ser classificada em clássica representada por 70-80% dos casos e bulbar em 20-30% dos acometimentos (KIERNAN et al., 2011; PRADO et al., 2016). A forma clássica da ELA é caracterizada pela degeneração dos NMS e NMI, apresentando como sintomas iniciais, principalmente, a fraqueza e posterior perda dos movimentos em membros superiores e inferiores, hiperreflexia, câibras, fasciculações e espasticidade (SWINNEN; ROBBERECHT, 2014; OSKARSSON; GENDRON; STAFF, 2018).

A ELA bulbar é definida pela degeneração inicial de NMI na região do bulbo, responsáveis pelo controle dos músculos da face, boca, garganta e língua. Sendo considerada a forma mais grave da doença, a ELA bulbar apresenta como sintomas iniciais, disartria, disfagia, disfonia, atrofia e fasciculações da língua e insuficiência respiratória (SWINNEN; ROBBERECHT, 2014; OSKARSSON; GENDRON; STAFF, 2018).

A diversidade de manifestações clínicas e a velocidade de progressão da ELA tornam o diagnóstico um desafio, não havendo um teste específico para identificação da doença. O diagnóstico é realizado a partir de dados clínicos, seguindo os critérios do *El Escorial*, e auxiliado por exame de eletroneuromiografia. Tais critérios foram propostos pela Federação Mundial de Neurologia em 1994 e reformulado nos anos de 2000 e 2008, possibilitando a categorização dos casos como definitivos ou prováveis (BROOKS et al., 2000; SILANI et al., 2011; WANG et al., 2017).

Contudo, a ELA continua sem cura, apresentando evolução progressiva e fatal, com sobrevida média entre três a cinco anos após o início dos sintomas (VUCIC; ROTHSTEIN; KIERNAN, 2014; HARDIMAN et al., 2017). Atualmente, a opção terapêutica é limitada ao uso do Riluzol, medicamento bloqueador de neurotransmissão glutamatérgica, aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 1995, que diminui lesões causadas nos neurônios motores. Estudos demonstram que a sobrevida é aumentada em 3 a 6 meses com o uso do medicamento, principalmente quando utilizado nos estágios iniciais da doença (JAISWAL, 2019).

Há muitas discussões e ensaios sobre formas de tratamento para a doença, contudo nenhum foi comprovadamente eficaz. A gravidade da ELA, a falta de tratamento efetivo e a rápida progressão tem alavancado a pesquisa pela cura da doença com várias abordagens sendo exploradas, embora a ausência de biomarcadores seja, provavelmente, um dos fatores

limitantes para o avanço na busca do tratamento (OSKARSSON; GENDRON; STAFF, 2018).

O Edaravone, aprovado em 2017 pelo FDA, é um medicamento intravenoso utilizado no tratamento da ELA ainda não liberado no Brasil, sendo somente comercializado nos Estados Unidos e Japão. Esse fármaco atua na eliminação de peróxidos lipídicos e radicais livres, protegendo o organismo contra o estresse oxidativo (OSKARSSON; GENDRON; STAFF, 2018). Os primeiros ensaios clínicos, executados em 2001, apontaram uma eficácia promissora desse medicamento nos estágios iniciais da doença ao impedir a degeneração da função motora em portadores de ELA. Entretanto, resta ainda determinar se o medicamento pode prolongar o tempo de vida dos pacientes, fomentando novas pesquisas que buscam esclarecer essa problemática (YOSHINO, 2019).

Além disso, nos últimos anos, a procura por tratamento efetivo para ELA tem incentivado estudiosos a avaliar a utilização de terapias com células-tronco, empregando diversos tipos celulares. Porém, as abordagens utilizando essas células, buscam principalmente proteger os neurônios motores remanescentes, e não substituir os neurônios degenerados (ABDUL WAHID et al., 2016). Assim, as opções terapêuticas indicadas para ELA até os dias atuais são paliativas, com o objetivo de proporcionar uma melhora na qualidade de vida e maior sobrevida aos pacientes (OSKARSSON; GENDRON; STAFF, 2018).

Adicionalmente, os fatores subjacentes ao processo neurodegenerativo na ELA permanecem incompreendidos. Diversos mecanismos celulares e moleculares foram relacionados, como disfunção mitocondrial, falha no transporte axonal, agregação proteica, excitotoxicidade pelo glutamato, hipermetabolismo e estresse oxidativo (Figura 2). Embora não esteja esclarecido se essa correlação seria causa ou consequência da doença, esses fatores são reconhecidos como desencadeadores de vias apoptóticas, levando a crer que favoreçam a degeneração de motoneurônios (VUCIC; ROTHSTEIN; KIERNAN, 2014; WEIDUSCHAT et al., 2014; BLASCO et al., 2017; HARDIMAN et al., 2017).

Sabe-se, ainda, que a ELA é uma doença de etiologia multifatorial e complexa, abarcando fatores genéticos e ambientais (VUCIC; ROTHSTEIN; KIERNAN, 2014; WEIDUSCHAT et al., 2014; BLASCO et al., 2017; HARDIMAN et al., 2017). Dentre os fatores genéticos implicados no desenvolvimento da ELA, vários foram os polimorfismos associados, podem-se citar os presentes nos genes *SOD1* (superóxido dismutase Cu/Zn), sendo esse o mais estabelecido e extensamente analisado, *TARDBP* ou *TDP-43* (proteína de

ligação ao DNA TDP-43), *FUS* (proteína de fusão envolvida na transcrição e splicing de RNA), *C9ORF72* (cromossomo 9 quadro de leitura aberto 72) e *VAPB* (proteína de membrana associada à vesícula B) (Figura 2) (DARBYSON; NGSEE, 2016; GHASEMI; BROWN, 2017).

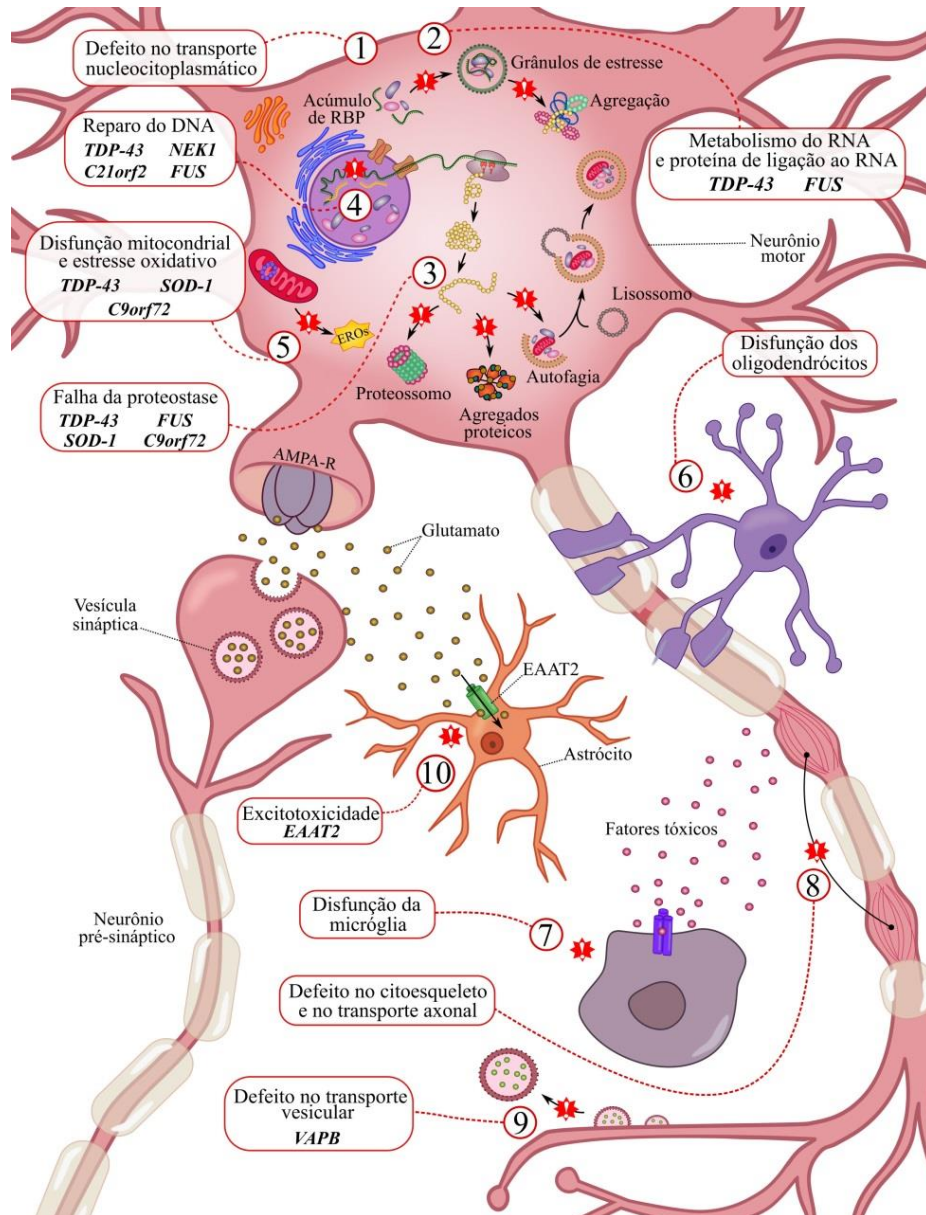


Figura 2. Mecanismos patológicos e polimorfismos genéticos relacionados ao desenvolvimento da ELA. AMPA-R: Receptor ionotrópico de glutamato; *C21orf2*: Cromossomo 21 quadro de leitura aberto 2; *C9orf72*: Cromossomo 9 quadro de leitura aberto 72; EAAT2: Transportador de aminoácido excitatório 2; EROs: Espécies reativas de oxigênio; *FUS*: Proteína de fusão envolvida na transcrição e splicing de RNA; *NEK1*: Gene A da quinase 1 relacionada ao NIMA; RBP: Proteína de ligação à RNA; *SOD1*: Superóxido dismutase Cu/Zn; *TDP-43*: Proteína de ligação ao DNA TDP-43; *VAPB*: Proteína de membrana associada à vesícula B.

Diversos fatores fisiopatológicos podem explicar o envolvimento dos polimorfismos que comprometem a atividade da enzima *SOD1* com a patogênese da ELA, entre eles a excitotoxicidade, disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo (POLLARI et al., 2014; HAYASHI; HOMMA; ICHIJO, 2015). Assim, devido à carência de um padrão hereditário estabelecido e a maior prevalência em determinados núcleos familiares, especulou-se que alterações genéticas associadas à exposição dos indivíduos a fatores tóxicos possibilitariam o desenvolvimento da ELA (ABRELA, 2013).

Alguns estudos apontam uma possível relação entre a exposição a certos agentes ambientais e a suscetibilidade à doença, apresentando como fatores causais exógenos a exposição a metais pesados e pesticidas, atividade física intensa, traumatismo craniano, tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, entre outros (TROJSI; MONSURRÒ; TEDESCHI, 2013; GUNNARSSON; BODIN, 2018). Esses fatores somados a alterações genéticas que prejudicam a detoxificação de compostos tóxicos, favorecem o estabelecimento do quadro de estresse oxidativo, influenciando na suscetibilidade à ELA (AL-CHALABI; HARDIMAN, 2013; OSKARSSON; HORTON; MITSUMOTO, 2015; RIANCHO et al., 2018).

1.2. Estresse Oxidativo como fator neurodegenerativo

Os radicais livres são moléculas instáveis e altamente reativas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. Existem diversos radicais livres, e esses são divididos de acordo com seu átomo central, destacando-se, principalmente, aqueles intermediários da redução do oxigênio molecular (O_2) à água (KALYANARAMAN, 2013; TARAFDAR; PULA, 2018).

Em condições fisiológicas normais, essas moléculas são continuamente produzidas como produtos do metabolismo, sendo contrabalanceadas por mecanismos antioxidantes (ELFAWY; DAS, 2019). Assim, em baixas concentrações a geração de radicais livres, como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs), é necessária para manutenção da homeostase celular, estando essas moléculas relacionadas a processos de sinalização, defesa contra microrganismos, resposta imune e a expressão de genes associados à resposta ao estresse celular (LUSHCHAK, 2014; TARAFDAR; PULA, 2018).

Porém, quando há um desequilíbrio entre agentes pro-oxidantes e antioxidantes tem-se o estabelecimento de um quadro denominado estresse oxidativo (ELFAWY; DAS, 2019). Esse refere-se, portanto, a um desbalanceamento entre a produção de EROs e sua remoção

por meio das defesas antioxidantes, sendo potencialmente danoso à membranas, por meio da peroxidação lipídica, ao DNA e as mitocôndrias (SMEYNE; SMEYNE, 2013; ESPINOSA-DIEZ et al., 2015; MAZZETTI et al., 2015).

Em humanos, cada tecido possui um grau variado de suscetibilidade ao estresse oxidativo. Devido, principalmente, aos baixos níveis de antioxidantes e a alta disponibilidade de substratos oxidantes, a grande produção de radicais livres torna o cérebro sensível ao acúmulo de EROs (POPA-WAGNER et al., 2013; TARAFDAR; PULA, 2018). Além disso, esse órgão consome 20% do O_2 corporal e possui uma baixa capacidade de regeneração celular quando comparado a outros órgãos, o que o torna extremamente vulnerável aos danos oxidativos (ISLAM, 2016; TARAFDAR; PULA, 2018).

Os neurônios estão entre os tipos celulares mais ativos no metabolismo oxidativo, demandando um equilíbrio entre oferta e gasto de glicose e O_2 . O alto consumo de O_2 pela respiração celular, associado a baixos níveis de enzimas antioxidantes presentes nessas células, as expõe ao estresse oxidativo. Conseqüentemente, o déficit na atividade de enzimas de defesa antioxidante é capaz de inferir a suscetibilidade dos neurônios ao dano oxidativo (SMEYNE; SMEYNE, 2013; MAZZETTI et al., 2015).

Os danos causados às biomoléculas pelo estresse oxidativo são cumulativos e, acredita-se que exerçam um importante papel no desenvolvimento de doenças relacionadas à idade, como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, dentre outras (MAZZETTI et al., 2015; KUMAR et al., 2017). Estudos demonstram que durante o processo de envelhecimento, foram relatados altos níveis de estresse oxidativo e déficit de funções antioxidantes na região do córtex cerebral humano, tornando essa área mais suscetível a neurodegeneração (SALMINEN; PAUL, 2014; MAZZETTI et al., 2015). Portanto, esse mecanismo é indicado como uma das principais particularidades de qualquer processo neurodegenerativo, e assim, considera-se sua relação com o desenvolvimento da ELA (WEIDUSCHAT et al., 2014).

Intracelularmente, as EROs são produzidas em locais como o citosol, peroxissomos e retículo endoplasmático, no entanto, aproximadamente 90% dessas espécies são geradas nas mitocôndrias (DAI et al., 2014; SHEFA et al., 2019). Especialmente no cérebro, essas organelas podem ser encontradas em corpos celulares, axônios, dendritos e botões sinápticos, produzindo EROs pelo escape de elétrons da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (ISLAM, 2016; TARAFDAR; PULA, 2018).

As mitocôndrias convertem cerca de 1-5% do O_2 em EROs, principalmente pelo

complexo I (NADH desidrogenase) e III (Ubiquinona: citocromo *c*-oxidorreductase) da cadeia transportadora de elétrons, a medida que a ubiquinona parcialmente reduzida ($Q^{\cdot-}$) doa elétrons para o O_2 , formando assim o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Esse radical pode espontaneamente ou pela ação da SOD, ser transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e, apesar de não ser um radical livre por não possuir um elétron desemparelhado, o H_2O_2 é um oxidante efetivo em diversas biomoléculas. O H_2O_2 pode então ser reduzido a água pela Catalase (CAT) ou pela Glutaciona peroxidase (GPx), ou ainda, reagir com metais de transição, como ferro (Fe^{2+}) e cobre (Cu^+), para produzir o radical hidroxila (HO^{\cdot}), considerado o radical livre mais reativo (Figura 3) (NELSON; COX, 2014; ISLAM, 2016; TARAFDAR; PULA, 2018; AGNIHOTRI; ARUOMA, 2019).

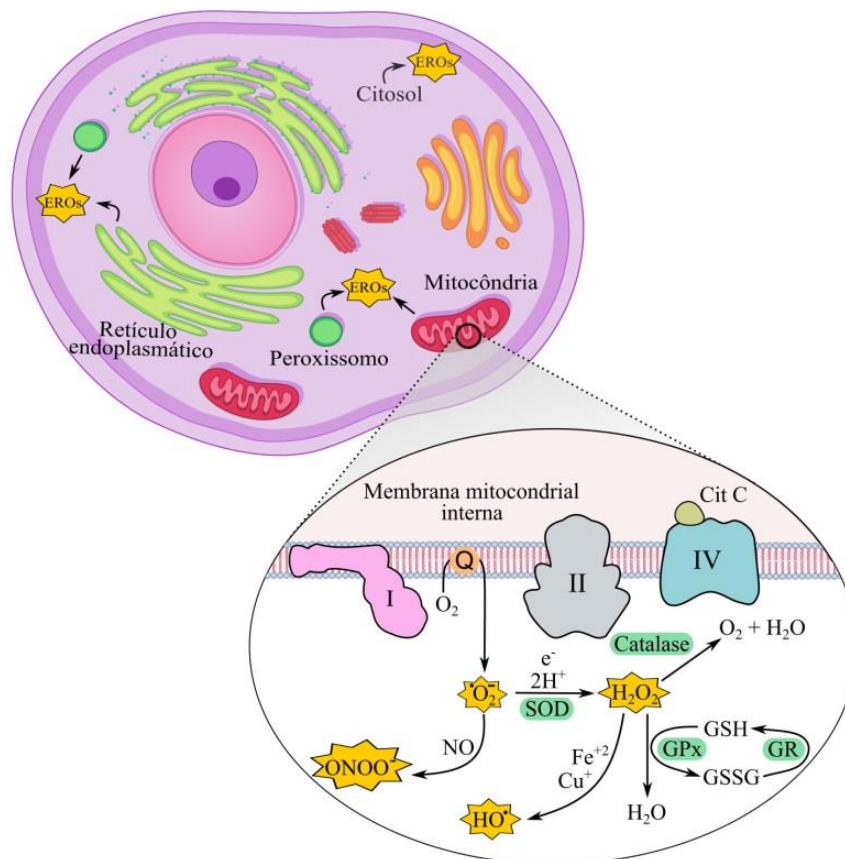


Figura 3. Formação de espécies reativas de oxigênio e principais enzimas antioxidantes atuantes. Cu^+ : Cobre; e^- : Elétron; EROs: Espécies reativas de oxigênio; $O_2^{\cdot-}$: Superóxido; Fe^{2+} : Ferro; GR: Glutaciona Redutase; GSH: Glutaciona reduzida; GSSG: Glutaciona oxidada; GPx: Glutaciona Peroxidase; H^+ : Íon de hidrogênio; H_2O_2 : Peróxido de hidrogênio; H_2O : Água; HO^{\cdot} : Hidroxila; NO: Óxido nítrico; O_2 : Oxigênio molecular; $ONOO^{\cdot-}$: Peroxinitrito; SOD: Superóxido dismutase.

A ordenação mitocondrial nos terminais nervosos pré-sinápticos pressupõe sua atividade a partir de respostas coordenadas a diversos estímulos. Sendo assim, a principal resposta da mitocôndria perante o estresse é a alteração da permeabilidade mitocondrial, com posterior colapso do potencial de membrana e a produção exacerbada de EROs (Figura 2). Isso induz a disseminação da permeabilidade para mitocôndrias subjacentes e acarreta no efeito conhecido como “liberação de EROs induzida por EROs” (POLLARI et al., 2014). Diversas doenças foram relacionadas a essa disfunção mitocondrial, principalmente as doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson, Huntington e ELA (NIEDZIELSKA et al., 2016; ELFAWY; DAS, 2019).

Além disso, a produção de EROs no sistema nervoso central (SNC) também está relacionada à hipótese da excitotoxicidade, caracterizada pela função aberrante do receptor de glutamato (Figura 2) (WEIDUSCHAT et al., 2014). O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório, responsável pelo influxo de cálcio (Ca^{2+}) no processo de despolarização da membrana. A disfunção nos receptores desse aminoácido acarreta em desregulação da homeostase celular, gerando maior influxo de Ca^{2+} , fato que resulta na superativação da enzima Óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), responsável por produzir óxido nítrico (NO). O excesso deste reage com o O_2^- formando peroxinitrito (ONOO^-) (Figura 3), um ânion extremamente reativo que ocasiona danos celulares (CARVALHO; MOREIRA, 2018; ELFAWY; DAS, 2019). Além disso, sabe-se que a redução da biodisponibilidade do NO resulta em uma diminuição de suas propriedades vasodilatadoras, antiproliferativas e anti-inflamatórias (DE SILVA; MILLER, 2016; CARVALHO; MOREIRA, 2018).

Estudos relatam sinais de processo inflamatório e ativação do sistema imune em processos neurodegenerativos. As células da glia, principalmente a micróglia e os astrócitos, são células responsáveis por fornecer suporte e proteção aos neurônios, mantendo a homeostase celular (MALASPINA; PUENTES; AMOR, 2015). A micróglia atua como primeira linha de defesa do SNC, sendo considerada componente do sistema imune inato. Sua ativação foi verificada no córtex motor, tronco encefálico, trato corticoespinal, medula espinal e líquido cefalorraquidiano de pacientes recém-diagnosticados com ELA (BANATI et al., 1995; BOWERMAN et al., 2013).

A ativação microglial leva a liberação de mediadores pró-inflamatórios que favorecem a disfunção da barreira hematoencefálica (BHE) e o influxo de leucócitos da periferia para o SNC (GONZÁLEZ; PACHECO, 2014). Com a progressão da doença, os fatores pró-inflamatórios liberados ativam os astrócitos, acarretando na redução de fatores neurotróficos,

hiporegulação dos transportadores de glutamato e na liberação de fatores neurotóxicos e citocinas pró-inflamatórias (Figura 2) (ZHAO; BEERS; APPEL, 2013; HOOTEN et al., 2015; PRADO et al., 2018).

O estresse oxidativo pode ainda causar o aumento da permeabilidade da BHE, uma barreira física que controla o transporte de água e moléculas e protege contra compostos tóxicos e patógenos. O aumento dessa permeabilidade favorece a entrada e acúmulo de substâncias neurotóxicas, diminuindo a entrega de nutrientes ao SNC, o que leva, possivelmente, à disfunção sináptica e morte neuronal (CARVALHO; MOREIRA, 2018; TARAFDAR; PULA, 2018).

Assim, o estresse oxidativo associado a condições inflamatórias no cérebro geram desmielinização e dano axonal, prejudicando a condução de sinais nervosos, o que acarreta em perda de funções como sensação e movimento (POPA-WAGNER et al., 2013; TARAFDAR; PULA, 2018). Desta forma, os mecanismos de disfunção mitocondrial, excitotoxicidade, desequilíbrio do influxo de Ca^{2+} , aumento da permeabilidade da membrana e processos inflamatórios estimulam a maior produção de EROs. Os efeitos acumulativos desse processo iniciam a via apoptótica intrínseca, acarretando na morte de motoneurônios (POLLARI et al., 2014; ISLAM, 2016).

Assim, há evidências substanciais para sugerir a atividade de radicais livres e o estabelecimento do estresse oxidativo como fatores de risco para o desenvolvimento de doenças neurológicas, como Alzheimer, Esquizofrenia, Parkinson e ELA (D'AMICO et al., 2013; NIEDZIELSKA et al., 2016; TARAFDAR; PULA, 2018). O estresse oxidativo pode estar relacionado a uma variedade de eventos celulares em neurônios motores, favorecendo a degeneração e morte dos mesmos (D'AMICO et al., 2013).

Contudo, o organismo possui mecanismos variados que visam promover a detoxificação celular contra o estresse oxidativo. Os mecanismos de detoxificação englobam a atividade de enzimas como SOD, que converte o O_2^- em H_2O_2 , que por sua vez, pode ser degradado pelas enzimas CAT ou GPx. Têm-se ainda, a atuação da Glutathiona reduzida (GSH) (Figura 3), responsável por detoxificar EROs, bem como xenobióticos e metabólitos reativos, sendo esta substrato para enzimas como, GPx e Glutathiona S-transferases (GSTs) (MAZZETTI et al., 2015; ALLOCATI et al., 2018; ELFAWY; DAS, 2019).

Assim, outro fator relevante para contribuição do estresse oxidativo na patogênese da ELA é a disfunção da homeostase de enzimas relacionadas à detoxificação celular, como a GSH, bem como dos níveis e/ou funções alteradas das GSTs. Estudos *ex vivo* relataram

baixos níveis de GSH no sangue, urina, líquido cefalorraquidiano e tecido espinhal de pacientes portadores de ELA (POLLARI et al., 2014; WEIDUSCHAT et al., 2014; NIEDZIELSKA et al., 2016). Diversos fatores podem esclarecer esses achados, como o aumento do consumo de antioxidantes para neutralizar EROs, bem como a excitotoxicidade pelo glutamato, que pode afetar a produção da GSH (WEIDUSCHAT et al., 2014).

As funções detoxificantes da GSH e GSTs são, portanto, particularmente relevantes nos neurônios devido à produção de EROs associado aos baixos níveis de antioxidantes nessas células, tornando-os sensíveis ao estresse oxidativo (ALLOCATI et al., 2018). Dessa forma, supõe-se que a via de metabolismo de xenobióticos e a variação em genes envolvidos no processo de detoxificação celular, possam estar relacionadas ao risco de desenvolvimento da ELA (EUM et al., 2015; ALLOCATI et al., 2018).

1.3. Sistema Glutationa S-transferase

Continuamente, os seres humanos são expostos a substâncias exógenas e endógenas que podem causar danos ao organismo. Porém, existem mecanismos de detoxificação celular onde o organismo atua contra xenobióticos, assim como metabólitos e excesso de EROs e ERNs produzidos intracelularmente (MAZZETTI et al., 2015; SUTHAR et al., 2018). Esses mecanismos antioxidantes são classificados em enzimáticos e não enzimáticos, e embora, no primeiro caso, sejam necessários um grande número de enzimas para metabolizar essas substâncias, a detoxificação celular é dividida em três fases principais (KURUTAS, 2016; IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

Inicialmente, os compostos são metabolizados pelas enzimas de fase I, a maioria destas pertencentes à família Citocromo P450, ocorrendo reações de bioativação, onde há a conversão dos compostos originais em metabólitos polares, por intermédio de mecanismos como oxidação, redução e hidrólise (CHOUDHURY et al., 2015; KURUTAS, 2016). Os produtos dessa fase podem ser eliminados diretamente ou participarem das reações de fase II. Na segunda fase, as enzimas GSTs, realizam a conjugação de compostos eletrofílicos à GSH, tornando-os mais hidrofílicos, o que facilita sua excreção (Fase III) (Figura 4) (KURUTAS, 2016; ALLOCATI et al., 2018).

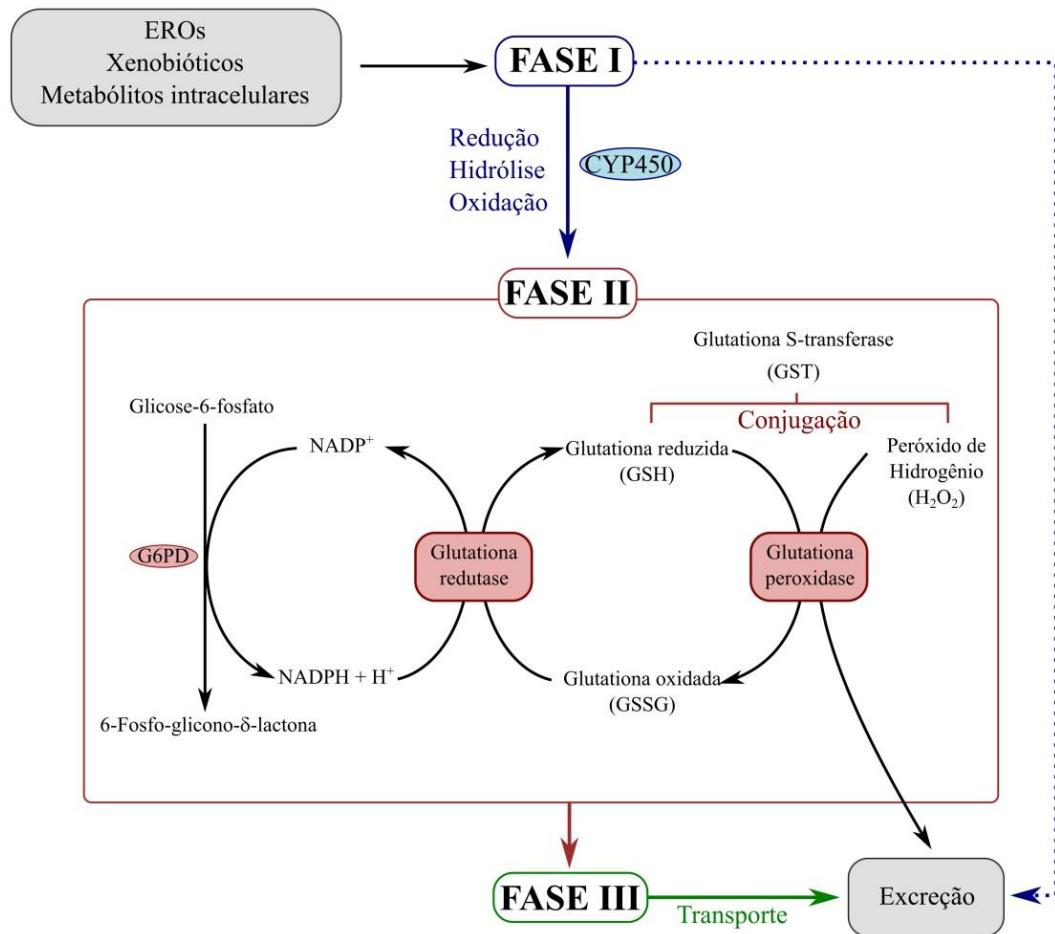


Figura 4. Representação esquemática das fases do processo de detoxificação celular, com ênfase na fase II. CYP450: Citocromo P450; EROs: Espécies reativas de oxigênio; G6PD: Glicose-6-fosfato desidrogenase; H⁺: Íon de hidrogênio; NADP⁺: Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida oxidado; NADPH: Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido.

A GSH é um tripeptídeo formado a partir dos aminoácidos cistéina, glicina e ácido glutâmico, durante a via de transulfuração da homocisteína (DOS ANJOS et al., 2018). No cérebro, os níveis dessa proteína são mais baixos quando comparados a outros tecidos, devido à toxicidade de altas concentrações de seus precursores (MAZZETTI et al., 2015).

Nas mitocôndrias, a GSH atua na regulação da apoptose e, no núcleo é considerada regulador chave da divisão celular (FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009). No entanto, é principalmente reconhecida por ser o antioxidante de baixo peso molecular mais importante nas células. Durante a detoxificação de compostos eletrofílicos, a GSH é oxidada à glutationa dissulfeto (GSSG) na presença de fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido (NADPH), oriundo da via das pentoses-fosfato, reduzindo espécies oxidantes, sendo

utilizada, portanto, em reações catalisadas via GPx e GSTs (Figura 4) (MAZZETTI et al., 2015).

A família GST (EC.2.5.1.18) consiste em enzimas multigênicas importantes na proteção celular, envolvidas na detoxificação de produtos do estresse oxidativo, xenobióticos e EROs (SUTHAR et al., 2018). As GSTs participam de diversos processos intracelulares como os relacionados à resposta ao estresse, previamente mencionado, a replicação celular, modulação de vias de sinalização, apoptose e ao estabelecimento de resistência a medicamentos (HAYES; STRANGE, 2000; ZMORXYNSKI et al., 2015).

No cérebro, as GSTs foram localizadas principalmente em astrócitos, neurônios e tecidos periféricos (KUMAR et al., 2017; DASARI et al., 2018a). Estudos relatam que a superexpressão de genes da família GSTs nos neurônios interrompeu o processo neurodegenerativo, sugerindo um efeito protetor dessas enzimas atuantes no processo de detoxificação celular (WHITWORTH et al., 2005; MAZZETTI et al., 2015).

Em mamíferos, as GSTs são classificadas em: citosólica, mitocondrial e microsomal, sendo esta última associada à membrana. Dentre as citosólicas humanas encontram-se 7 classes subdivididas de acordo com a sequência de aminoácidos, propriedades imunológicas, pontos isoelétricos e a especificidade ao substrato: Alpha (α), Mu (μ), Theta (θ), Pi (π), Sigma (σ), Omega (ω) e Zeta (ζ) (PINHEIRO et al., 2013; ESLAMI; SAHEBKAR, 2014). A maioria dos genes da família GST são polimórficos, acarretando em alterações nas atividades dessas enzimas, o que torna os indivíduos portadores desses polimorfismos, suscetíveis a diversas doenças (ZHANG et al., 2013; PINHEIRO et al., 2017; ADIBHESAMI et al., 2018; DASARI et al., 2018a; DE LIMA et al., 2018).

As GSTs citosólicas compartilham características como o fato de serem proteínas diméricas, possuírem massa molecular entre 23 e 30 kDa, e conter de 199 a 244 aminoácidos (TEW et al., 2011; DASARI et al., 2018b). Cada subunidade de GST possui um sítio ativo constituído por duas regiões funcionais diferentes: o sítio G hidrofílico presente no domínio N-terminal da proteína, onde é realizada a ligação com a GSH, e um sítio H no domínio C-terminal, que realiza a ligação com os compostos eletrofílicos. O sítio G é preservado entre as classes de GSTs devido à alta especificidade, porém o sítio H possui variações entre as GSTs, revelando uma ampla especificidade a depender do substrato (TEW et al., 2011; WU; DONG, 2012; BOARD; MENON, 2013; DOS ANJOS et al., 2018).

A classe Mu apresenta cinco genes distintos: *GSTM1*, *GSTM2*, *GSTM3*, *GSTM4* e *GSTM5*, sendo todos mapeados no braço curto do cromossomo 1. O gene *M1*

(MIM*138.350) é polimórfico e apresenta dois alelos funcionais (*GSTM1**A e *GSTM1**B), ambos eficientes no processo de detoxificação. A classe Theta contém dois genes, *GSTT1* e *GSTT2*, situados no braço longo do cromossomo 22 (BOARD; MENON, 2013; BENABDELKRIM; DJEFFAL; BERREDJEM, 2018).

Destacam-se os genes *M1* e *T1*, principalmente devido a grande quantidade de estudos sobre a associação dos polimorfismos de deleção nesses genes com a suscetibilidade a diversas doenças (PINHEIRO et al., 2013, 2017; ESLAMI; SAHEBKAR, 2014; BENABDELKRIM; DJEFFAL; BERREDJEM, 2018). No entanto, a influência desses no desenvolvimento da ELA ainda não foi explorada.

1.4. Polimorfismos de deleção dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e sua possível associação com a ELA

Dentre as classes citosólicas humanas da família GSTs, destacam-se duas isoenzimas: *GSTM1*, codificada pelo gene de mesmo nome, localizado em 1p13.3, apresentando 8 éxons; e *GSTT1*, codificada pelo gene *GSTT1* (MIM*600.436) situado em 22q11.2, contendo 5 éxons (CURIONI et al., 2013; DASARI et al., 2018a). O polimorfismo presente nesses genes caracteriza-se pela deleção total do gene, resultando em um genótipo homocigótico nulo (*GSTM1*-nulo e *GSTT1*-nulo), definido pela ausência de atividade enzimática dessas isoformas (PEJOVIC-MILOVANCEVIC et al., 2016; KUMAR et al., 2017).

Trocas homólogas desiguais envolvendo regiões flanqueadoras resultam na deleção dos genes. Essas regiões possuem alta identidade, sendo identificadas como pontos de deleção/junção do genótipo nulo (REIS, 2010). Os polimorfismos de deleção dos genes *GSTM1* e *GSTT1* são corriqueiros na população humana. Contudo, suas frequências são variáveis, verificando-se disparidades geográficas e étnicas. A prevalência do genótipo *GSTM1*-nulo varia em caucasianos de 47-57%, em asiáticos de 42-54% e em africanos de 16-36%, enquanto o genótipo *GSTT1*-nulo em caucasianos foi de 13-26%, sendo mais comum na população asiática com frequência de 35-52% (SAITOU; ISHIDA, 2015; SUTHAR et al., 2018).

A suscetibilidade a doenças inerentes a cada população e as respostas interindividuais à toxicidade como consequência do genótipo nulo, podem ser os responsáveis pela variação dos genótipos encontrados entre as populações (ZHANG et al., 2013). Estudos demonstram que somente cerca de 10% de todos os indivíduos possuem genótipo duplo nulo (*GSTM1*-nulo e

GSTT1-nulo), o que os torna mais propensos a danos ocasionados pelo estresse oxidativo (BENABDELKRIM; DJEFFAL; BERREDJEM, 2018).

Apesar das deleções de *GSTM1* e *GSTT1* serem corriqueiras na população mundial, os polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo de xenobióticos são, em sua maioria, polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), as deleções são menos frequentes e a ausência completa do gene é considerada rara. Portanto, demonstra-se a razão pelo qual os polimorfismos de deleção total do gene têm atraído pesquisadores e se tornado alvo de várias pesquisas. A hipótese geral é de que a atividade enzimática normal ou aumentada das GSTs possa proteger os tecidos por meio da detoxificação de compostos nocivos, sendo esperado que a deleção dos genes provoque a redução da capacidade detoxificante, expondo assim os indivíduos com genótipo nulo a um maior risco de desenvolver várias doenças (TEAMA, 2018).

Os alelos funcionais de *GSTM1* possuem a capacidade de detoxificar genotoxinas como epóxidos de hidrocarbonetos aromáticos e produtos do processo oxidativo como hidroperóxidos de DNA e diol epóxido de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, enquanto *GSTT1* realiza a detoxificação dos principais constituintes da fumaça do cigarro como haleto de alquila e diol epóxido do benzo[a]pireno (KASTHURINAIDU et al., 2015).

Assim, em decorrência das variações genéticas na população, a capacidade de detoxificação difere de forma interindividual, podendo existir casos onde ocorra um desbalanceamento de atividade entre as Fases I e II de detoxificação celular, que acarreta em um aumento de metabólitos eletrofílicos e resulta em efeitos deletérios para biomoléculas (ZHANG et al., 2013), bem como podem levar a morte neuronal por meio de alterações mitocondriais, neuroinflamação e estresse oxidativo (COSTA, 2017; RIANCHO et al., 2018).

Diversas pesquisas vêm associando o polimorfismo de deleção dos genes *GSTM1* e *GSTT1* ao risco de desenvolvimento de diversos tipos de câncer, como o cancro colorretal, renal e oral (XU et al., 2011; CHENG et al., 2012), além de relacioná-lo à patogênese de Diabetes *Melittus* 2 (PINHEIRO et al., 2013) e esquizofrenia refratária (PINHEIRO et al., 2017). Porém, são poucos os estudos que avaliam genes da família GSTs e a suscetibilidade à ELA (USAREK et al., 2005; WEIDUSCHAT et al., 2014; ALLOCATI et al., 2018).

Localizada em neurônios e astrócitos, a isoforma *GSTM1* desempenha um papel protetor nos neurônios dopaminérgicos (MAZZETTI et al., 2015; KUMAR et al., 2017). Relata-se, que a presença de *GSTM1* retarda o início da doença de Parkinson, ao passo que o

genótipo nulo foi considerado fator de risco para essa e outras doenças, como Alzheimer. Enquanto, a deleção do gene *GSTT1* está relacionada à suscetibilidade a doença de Parkinson, Esquizofrenia e Alzheimer, sendo a presença desse gene um possível fator de proteção contra essas doenças (KUMAR et al., 2017; DASARI et al., 2018a). Além disso, a deleção de ambos os genes estão associados a menor sobrevivência de pacientes com glioma (DASARI et al., 2018a).

Dessa forma, torna-se evidente a importância do sistema GST para defesa celular contra agentes tóxicos, bem como o fato de que o déficit de enzimas atuantes no processo de detoxificação podem corroborar com o quadro de estresse oxidativo observado em diversas doenças neurodegenerativas, incluindo a ELA (ALLOCATI et al., 2018; DASARI et al., 2018a). Contudo, ainda são poucos os estudos genéticos sobre a ELA, principalmente na população brasileira (USAREK et al., 2005; WEIDUSCHAT et al., 2014; ALLOCATI et al., 2018). Nesse sentido, esse é o primeiro estudo que busca investigar a associação dos polimorfismos de *GSTM1* e *GSTT1* no risco de desenvolvimento da ELA, contribuindo com o conhecimento sobre genes possivelmente implicados na patogênese da doença.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Investigar os polimorfismos de deleção dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e sua associação com o desenvolvimento da ELA em pacientes do Estado de Goiás - Brasil.

2.2. Objetivos específicos

- Descrever os parâmetros clínicos e demográficos dos pacientes portadores de ELA do Centro Estadual de Reabilitação e Readaptação Dr. Henrique Santillo (CRER);
- Determinar e comparar as frequências genotípicas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* nos indivíduos portadores e não portadores de ELA;
- Avaliar a correlação do polimorfismo de deleção dos genes *GSTM1* e *GSTT1* com a suscetibilidade ao desenvolvimento de ELA;
- Correlacionar os polimorfismos de deleção dos genes *GSTM1* e *GSTT1* com o perfil clínico e demográfico dos pacientes portadores de ELA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Declaração de ética

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (CEP-UFG), sob o protocolo 2.496.856/2018. Todos os participantes concordaram voluntariamente em participar do estudo após esclarecimentos sobre seu objetivo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Todos os pacientes concordaram em participar do estudo e não houve retiradas.

3.2. População de estudo

Neste estudo caso-controle, foram selecionados para o grupo caso 101 pacientes diagnosticados com ELA do Centro Estadual de Reabilitação e Readaptação Dr. Henrique Santillo (CRER), Goiânia, Goiás, Brasil, centro de referência do Estado de Goiás em reabilitação de doenças neuromotoras, entre os anos de 2017 e 2019. Um total de 119 indivíduos sem diagnóstico de doenças neurodegenerativas (ALS, Parkinson, Alzheimer, Huntington e Esclerose Múltipla) foram selecionados no Laboratório de Análises Clínicas e Educação em Saúde (LACES) da UFG para compor o grupo controle.

Ambos os grupos foram pareados por sexo e idade para evitar esses possíveis fatores de confusão. Os critérios para pareamento e inclusão foram estabelecidos de acordo com as diretrizes do STrengthening the REporting of Genetic Association (STREGA) para melhor relato de estudos de associação genética (LITTLE et al., 2009).

Os critérios de seleção dos grupos estudados foram:

a) Inclusão: pacientes com idade mínima de 18 anos e máxima de 90 anos, independentemente do estágio de progressão da doença, que seguiram o protocolo de exames laboratoriais e de imagem definidos para a doença e padronizados pelo CRER;

b) Exclusão: protocolo CRER incompleto e impossibilidade de coleta de sangue venoso periférico.

Dados clínicos e demográficos foram extraídos de prontuários e questionários, que incluíam tópicos como hábitos de vida (tabagismo e consumo de álcool), idade ao diagnóstico, prática de atividade física, histórico ocupacional e histórico familiar de doenças neurodegenerativas. Fumantes foram definidos como aqueles pacientes que relataram usar

cigarro por mais de um ano, e consumidores de álcool aqueles que relataram consumo regular por pelo menos um ano antes do diagnóstico de ELA. Os procedimentos referidos foram realizados seguindo os Princípios Éticos para Pesquisa Médica envolvendo Seres Humanos da Declaração da Associação Médica Mundial de Helsinque.

3.3. Análises genéticas

As análises genéticas foram realizadas no Laboratório de Patologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil. Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos contendo EDTA, identificadas e armazenadas adequadamente a -80 °C. Posteriormente, as amostras foram submetidas à extração de DNA usando procedimento padrão (Purilink Invitrogen da Life Technologies®, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O material genômico purificado foi avaliado espectrofotometricamente com NanoDrop™ ND-1000 (ThermoFisher®, EUA) e, em seguida, diluído em água Milli-Q estéril até uma concentração final de 10 ng/μl de DNA.

A genotipagem dos polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1* foi realizada utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Multiplex (qPCR) usando o fluoróforo SYBR® Green I (Sso Advanced™ Universal Super Mistura Verde SYBR®- Bio-Rad, EUA). A definição dos genótipos nulo e presente foi determinada pela análise das curvas de *melting* produzidas após a amplificação. A co-amplificação da região *RH92600*, uma região microssatélite localizada em 6q13, foi utilizada como controle endógeno da reação. O genótipo nulo é definido pela deleção completa de ambos os alelos (deleção homozigótica), e a presença de pelo menos um alelo caracteriza o genótipo presente (PINHEIRO et al., 2013).

O material genômico foi amplificado usando os primers *GSTM1*: F- GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C e R- GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G (215pb); *GSTT1*: F- TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC e R- GGA AAA GGG TAC AGA CTG GGG A (257pb); *RH92600*: F- GCA ATT CCG CAT TTA ATT CAT GG e R- AAA CAG GCC ACG TAA AGC AAC (135pb), descritos anteriormente por Pinheiro et al. (2013).

Protocolos padronizados foram utilizados nas condições de ciclagem e reações que continham um volume final de 25 μL. Utilizamos aproximadamente 10 ng de DNA das amostras previamente quantificadas e diluídas, 0,4 μM de cada primer *GSTM1*, 0,3 μM de cada primer *GSTT1* e 0,5 μM de cada primer *RH92600*, 1X do SYBR Green qPCR Master Mix (Bio-Rad-USA), com a adição de 1,25 mM MgCl₂ (PINHEIRO et al., 2013). A análise

da curva de *melting* demonstrou os genótipos presentes de *RH92600* a 83 °C, *GSTM1* a 87 °C e *GSTT1* a 89 °C (Figura 5). A ausência de curvas correspondentes a *GSTM1* ou *GSTT1*, ou ambas, na presença do controle endógeno (*RH92600*), confirmou os respectivos genótipos nulos.

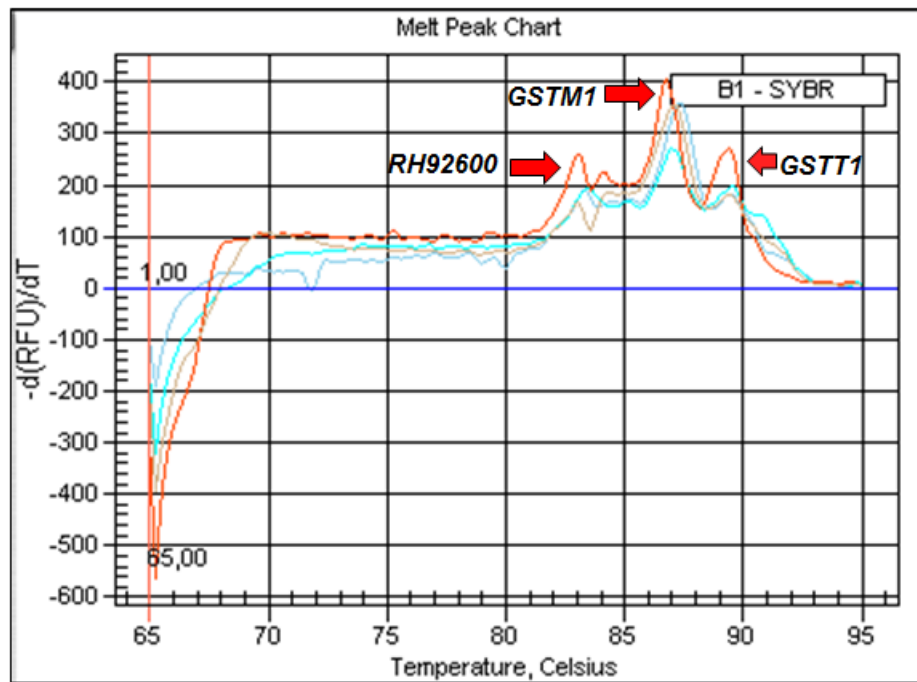


Figura 5. Curva de *melting* produzida na qPCR multiplex. Os picos correspondem aos genótipos presente de *RH92600* (83°C), *GSTM1* (87°C) e *GSTT1* (89°C).

3.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o pacote estatístico SPSS, versão 23. As variáveis categóricas foram descritas como frequência absoluta (n) e relativa (%), enquanto as variáveis contínuas foram descritas usando média e desvio padrão. Verificamos a normalidade dos dados usando o teste Kolmogorov-Smirnov. Os testes qui-quadrado de Pearson (χ^2) e qui-quadrado *post hoc* foram utilizados para avaliar a associação entre genótipos e possíveis combinações genóticas com o desenvolvimento da ELA (MACDONALD; GARDNER, 2000). O teste do qui-quadrado de Pearson também foi utilizado para avaliar a associação de genótipos com as variáveis clínicas e sociodemográficas dos pacientes afetados pela doença. Um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi utilizado em todas as análises.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização da população de estudo

Os 101 indivíduos com ELA e 119 sem diagnóstico de doenças neurodegenerativas foram avaliados quanto às principais variáveis demográficas. A média de idade dos grupos caso e controle foi de $57,3 \pm 12,8$ e $58,0 \pm 10,3$ anos, respectivamente (Tabela 1). A ocorrência da ELA está aumentando devido ao envelhecimento da população (WARD et al., 2014; CHIA; CHIÒ; TRAYNOR, 2018; NICOLAS et al., 2018), estudos com populações europeias relatam o início da doença em indivíduos com aproximadamente 65 anos (CHIO et al., 2013; VAN ES et al., 2017). Enquanto, em populações geneticamente heterogêneas, como no Brasil, seu início tende a ocorrer aproximadamente 10 anos antes. Essa diferença explica o acometimento de indivíduos cada vez mais jovens no país, corroborando a media de idade encontrada em nosso estudo (CHIO et al., 2013; VAN ES et al., 2017).

O grupo caso foi predominantemente composto por homens. As análises também mostraram maior frequência de consumo de álcool no grupo caso, revelando uma diferença significativa entre os grupos caso e controle ($p=0,01$) (Tabela 1). A associação entre consumo de álcool e o desenvolvimento de ELA é inconsistente. Alguns estudos não encontraram essa associação (OKAMOTO et al. 2009; D'OVIDIO et al., 2019), outras pesquisas recentes sugerem um papel protetor da ingestão de álcool no desenvolvimento da doença (HUISMAN et al., 2015; JI; SUNDQUIST; SUNDQUIST, 2016).

No entanto, alguns estudos também relatam a ingestão de álcool como fator de risco para o desenvolvimento da ELA. Tal fato foi relacionado, principalmente, ao metabolismo do álcool com a consequente produção de acetaldeído, um subproduto tóxico e reativo que favorece os danos aos tecidos e causa alterações no estado redox celular ao gerar EROs (VOLKOW et al., 2015; HERNÁNDEZ; LÓPEZ-SÁNCHEZ; RENDÓN-RAMÍREZ, 2016).

Quanto ao tabagismo, não houve diferença significativa entre os grupos caso e controle ($p=0,28$) (Tabela 1). Em relação ao uso de cigarros, estudos indicam que o risco de desenvolver ELA é 1,3 a 1,5 vezes maior para os fumantes, o que torna o tabagismo o único fator de risco estabelecido para a doença (WANG et al., 2011; CALVO et al., 2016). No entanto, embora o tabagismo e a exposição aos compostos tóxicos do cigarro possam contribuir para o desenvolvimento da ELA por meio de inflamação, neurotoxicidade e

estresse oxidativo (YU et al., 2014), esse estudo não revelou diferença significativa entre os grupos analisados.

Tabela 1. Caracterização demográfica e comparação dos grupos caso e controle.

	Grupos n (%)		Total	p
	Controle 119 (54,1)	Caso 101 (45,9)		
Idade (Média ± DP)	58,0 ± 10,3	57,3 ± 12,8	57,7 ± 11,5	0,64**
Sexo				
Feminino	68 (57,1)	45 (44,6)	113 (51,4)	0,08*
Masculino	51 (42,9)	56 (55,4)	107 (48,6)	
Ingestão de álcool				
Não	84 (70,6)	55 (54,5)	139 (63,2)	0,01*
Sim	35 (29,4)	46 (45,5)	81 (36,8)	
Tabagismo				
Não	68 (57,1)	65 (64,4)	133 (60,5)	0,28*
Sim	51 (42,9)	36 (35,6)	87 (39,5)	

* Teste Qui-quadrado de Pearson; ** Teste t de Student.

DP = desvio padrão.

Outras análises demográficas, clínicas e epidemiológicas foram realizadas para o grupo caso. A discriminação da variável etnia revelou maior frequência de indivíduos brancos (48,5%) e pardos (44,6%). A menor ocorrência de ELA em indivíduos negros pode ser explicada por fatores genéticos que podem atuar como fator de proteção contra a doença nesse grupo étnico. Além disso, estudos confirmam que a ELA é menos frequente nas populações miscigenadas da América Latina quando comparada às populações européias e norte-americanas (ROBERTS et al., 2016; LOGROSCINO; PICCININNI, 2019; LUNA et al., 2019).

Assim, o perfil genético de indivíduos negros e o possível papel protetor da miscigenação no Brasil podem explicar a menor frequência da doença nessas populações. Entretanto, diferenças no acesso à saúde ou no status socioeconômico podem impactar essas variações (RECHTMAN et al., 2015; ROBERTS et al., 2016; LOGROSCINO; PICCININNI, 2019; LUNA et al., 2019).

Serviços gerais (36,6%), domésticos (13,9%) e administrativos (12,9%) foram as ocupações mais citadas pelos pacientes. Quanto à exposição ambiental, 71,3% dos pacientes com ELA não relataram nenhum tipo de exposição ambiental, enquanto os 28,7% restantes

foram expostos em algum momento da vida. A exposição a agrotóxicos foi a mais citada (38,2%), no entanto, o tempo de exposição não foi avaliado.

A ocupação e a exposição a vários produtos químicos, especialmente compostos agrícolas, como pesticidas, fertilizantes, herbicidas e inseticidas, também são considerados fatores de risco para o desenvolvimento da ELA (YU et al., 2014; EUM et al., 2015; GUNNARSSON; BODIN, 2018). Na literatura, maior suscetibilidade à ELA tem sido relacionada apenas a ocupações que exigem alto desempenho físico, bem como àquelas associadas à exposição a metais pesados - principalmente chumbo, produtos químicos ou produtos agrícolas (GUNNARSSON; BODIN, 2018; BLECHER et al., 2019).

A relevância das interações gene-ambiente no desenvolvimento da ELA incentiva uma investigação mais aprofundada sobre o papel dos fatores de risco ambientais, especialmente a exposição a produtos tóxicos na suscetibilidade à doenças. A escassez de estudos que considerem a associação de vários fatores de risco na patogênese da ELA pode justificar os resultados conflitantes sobre o potencial papel das toxinas ambientais (TROJSI; MONSURRÒ; TEDESCHI, 2013).

Além disso, 53,5% dos pacientes com ELA relataram praticar alguma atividade física, predominantemente caminhada e futebol, sendo consideradas atividades físicas de baixo impacto. Como mencionado anteriormente, somente a atividade física intensa tem sido relacionada à patogênese da ELA, além de traumas causados por esportes competitivos de alta intensidade (BLECHER et al., 2019).

A maioria dos pacientes não relatou manifestação de doenças antes do diagnóstico de ELA (53,5%), bem como complicações (70,3%) ou histórico familiar de doenças neurodegenerativas (59,4%). Em relação à etiologia, ELA esporádica (ELAE) foi predominante na amostra avaliada (94,1%), enquanto ELA familiar (ELAF) foi diagnosticada em 5,9% dos indivíduos.

O grupo ELA relatou maior acometimento de membros inferiores (62,4%), seguidos por membros superiores (14,9%). De acordo com sinais clínicos iniciais e membros afetados, 72,3% dos pacientes apresentam sintomas clássicos. Estudo transversal realizado no estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil, também revelou predominância da forma clássica da doença (70,5%), mas os membros inferiores foram menos afetados que os membros superiores (32,8% e 37,7%, respectivamente) (PRADO et al., 2016). Nossos resultados também revelam que 23,8% dos pacientes foram diagnosticados com a forma bulbar da doença, enquanto 3,9% foram diagnosticados com ELA juvenil.

Além disso, 75,2% dos pacientes relataram usar o medicamento Riluzol. Durante o estudo, 10,9% dos pacientes com ELA tiveram desfecho negativo (óbito), o intervalo de tempo entre diagnóstico e óbito foi de um a sete anos. A ELA tem uma progressão rápida, pois o dano ao neurônio motor se espalha gradualmente. No entanto, relatam-se casos de morte alguns meses após o diagnóstico e em alguns casos a sobrevivência há mais de 20 anos (ROBBERECHT; PHILIPS, 2013; CALZADA et al., 2016; PRADO et al. 2016; VAN ES et al., 2017; COATTI; CAVAÇANA; ZATZ, 2019).

4.2. Distribuição genotípica e a relação das deleções de *GSTM1* e *GSTT1* com o desenvolvimento da ELA e variáveis clínicas e demográficas

As frequências dos genótipos *GSTM1-nulo* e *GSTT1-nulo* no grupo caso foram de 41,6% e 12,9%, respectivamente. No grupo controle, as frequências foram de 42,9% e 13,4% para esses respectivos genótipos. Não houve diferenças significativas nos genótipos isolados entre os grupos analisados ($p=0,85$ e $p=0,90$, respectivamente) (Tabela 2). A frequência dos genótipos varia de acordo com a localização geográfica e etnia: o genótipo *GSTM1-nulo* está presente em 47-57% dos caucasianos, 42-54% dos asiáticos e 16-36% dos africanos. O genótipo *GSTT1-nulo* é mais frequente em asiáticos (35-52%) do que em caucasianos (13-26%) (SAITOU; ISHIDA, 2015; SUTHAR et al., 2018).

Tabela 2. Distribuição das frequências genotípicas de *GSTM1*, *GSTT1* e suas possíveis combinações na análise de risco para o desenvolvimento de ELA.

	Grupos n (%)		Total	<i>Odds Ratio</i> (IC inf. - sup.)	<i>p</i>
	Controle 119 (54,1)	Caso 101 (45,9)			
<i>GSTM1</i>					
Nulo	51 (42,9)	42 (41,6)	93 (42,3)	1,05 (0,61-1,80)	0,85*
Presente	68 (57,1)	59 (58,4)	127 (57,7)		
<i>GSTT1</i>					
Nulo	16 (13,4)	13 (12,9)	29 (13,2)	1,05 (0,48-2,31)	0,90*
Presente	103 (86,6)	88 (87,1)	191 (86,8)		
Genótipo					
<i>GSTM1/GSTT1</i>					
-/-	5 (4,2)	2 (2,0)	7 (3,2)	1,74 (0,33-9,16)	0,35**
-/+	46 (38,7)	40 (39,6)	86 (39,1)	0,99 (0,59-1,67)	0,89**
+/-	11 (9,2)	11 (10,9)	22 (10,0)	0,72 (0,30-1,72)	0,68**
+/+	57 (47,9)	48 (47,5)	105 (47,7)	1,06 (0,63-1,76)	0,96**

* Qui-quadrado de Pearson; ** Qui-quadrado *Post hoc*

n = frequência absoluta; % = frequência relativa; IC = intervalo de confiança.

A Tabela 2 também relata a frequência das possíveis combinações genóticas (*GSTM1:GSTT1*) nos grupos caso e controle. Nenhuma das combinações apresentou resultados significativos para associação com a doença: *GSTM1-nulo/GSTT1-nulo* (p=0,35), *GSTM1-nulo/GSTT1-presente* (p=0,89), *GSTM1-presente/GSTT1-nulo* (p=0,68) e *GSTM1 presente/GSTT1 presente* (p=0,96).

Diversos estudos demonstram que genes GST isolados podem não contribuir significativamente para o desenvolvimento de algumas patologias, devido à atividade compensatória das várias isoformas dessa superfamília. Esse fato pode explicar a não associação entre esses polimorfismos e o desenvolvimento da ELA encontrada em nosso estudo (FUCIARELLI et al., 2009; ESLAMI; SAHEBKAR, 2014; MAZZETTI et al., 2015).

Estudos apontam para a relação entre as deleções de *GSTM1* e *GSTT1* e a patogênese de doenças, como esquizofrenia (PINHEIRO et al., 2017), diabetes *mellitus* (PINHEIRO et al., 2013; ZHANG et al., 2013) e nefropatia diabética (DE LIMA et al., 2018). No entanto, nenhum estudo avaliou a associação entre os genes *GSTM1* e *GSTT1* e seus polimorfismos na patogênese da ELA. Destacando a importância desse estudo e incentivando novos estudos para melhor avaliar essa associação, pois diferenças étnicas e ambientais são relevantes em doenças complexas e multifatoriais, como a ELA.

A análise dos genótipos *GSTM1* em relação as variáveis clínicas e demográficas dos pacientes com ELA revelou uma diferença significativa entre o genótipo presente e as variáveis tabagismo (p=0,03) e exposição ambiental (p=0,02), independentemente do tempo e tipo de exposição (Tabela 3). A diferença significativa encontrada entre tabagismo e exposição ambiental e o genótipo *GSTM1-presente* reflete o maior número de genótipo presente no grupo caso e, conseqüentemente, a não associação entre a deleção de *GSTM1* e o desenvolvimento da ELA encontrada em nosso estudo.

Tabela 3. Associação dos genótipos nulo e presente de *GSTMI* ao perfil demográfico e clínico de pacientes com ELA.

	<i>GSTMI</i> n (%)		<i>p</i> *
	Nulo	Presente	
Sexo			
Feminino	22 (52,4)	23 (39,0)	0,18
Masculino	20 (47,6)	36 (61,0)	
Etnia			
Branco	21 (50,0)	28 (47,5)	0,76
Negro	2 (4,8)	5 (8,5)	
Pardo	19 (45,2)	26 (44,1)	
Praticantes de atividade física			
Não	24 (57,1)	23 (39,0)	0,07
Sim	18 (42,9)	36 (61,0)	
Exposição ambiental			
Não	35 (83,3)	37 (62,7)	0,02
Sim	7 (16,7)	22 (37,3)	
Ingestão de álcool			
Não	27 (64,3)	28 (47,5)	0,09
Sim	15 (35,7)	31 (52,5)	
Tabagismo			
Não	32 (76,2)	33 (55,9)	0,03
Sim	10 (23,8)	26 (44,1)	
Tipo			
Esporádico	38 (90,5)	57 (96,6)	0,19
Familiar	4 (9,5)	2 (3,4)	
Doença neurodegenerativa na família			
Não	28 (66,7)	32 (54,2)	0,21
Sim	14 (33,3)	27 (45,8)	
Complicações			
Não	30 (71,4)	41 (69,5)	0,83
Sim	12 (28,6)	18 (30,5)	
Patologias anteriores			
Não	23 (54,8)	31 (52,5)	0,82
Sim	19 (45,2)	28 (47,5)	
Uso do Riluzol			
Não	8 (19,0)	17 (28,8)	0,26
Sim	34 (81,0)	42 (71,2)	

* Qui-quadrado de Pearson; n = frequência absoluta; % = frequência relativa

Em relação ao polimorfismo em *GSTT1*, houve diferença significativa entre o genótipo *GSTT1-presente*, predominante no grupo caso, e o histórico familiar de doenças neurodegenerativas ($p=0,01$) (Tabela 4). Tal fato revela que, em nosso estudo, a deleção de *GSTT1* não influenciou no desenvolvimento da ELA. Atualmente, estudos que incluem a família de pacientes com ELA aumentaram consideravelmente, devido à evidência de que os mecanismos que atuam na suscetibilidade à ELA podem se assemelhar aos de doenças

neurológicas como Parkinson, Alzheimer e Demência Frontotemporal (NIEDZIELSKA et al., 2016; LONGINETTI et al., 2017; ELFAWY; DAS, 2019; RAGAGNIN et al., 2019).

Tabela 4. Associação dos genótipos *GSTT1* nulo e presente ao perfil demográfico e clínico de pacientes com ELA.

	<i>GSTT1</i> n (%)		<i>p</i> *
	Nulo	Presente	
Sexo			
Feminino	4 (30,8)	41 (46,6)	0,28
Masculino	9 (69,2)	47 (53,4)	
Etnia			
Branco	5 (38,5)	44 (50,0)	0,05
Negro	3 (23,1)	4 (4,5)	
Pardo	5 (38,5)	40 (45,5)	
Praticantes de atividade física			
Não	6 (46,2)	41 (46,6)	0,97
Sim	7 (53,8)	47 (53,4)	
Exposição ambiental			
Não	8 (61,5)	64 (72,7)	0,40
Sim	5 (38,5)	24 (27,3)	
Ingestão de álcool			
Não	4 (30,8)	51 (58,0)	0,07
Sim	9 (69,2)	37 (42,0)	
Tabagismo			
Não	9 (69,2)	56 (63,6)	0,69
Sim	4 (30,8)	32 (36,4)	
Tipo			
Esporádico	13 (100,0)	82 (93,2)	0,33
Familiar	0 (0,0)	6 (6,8)	
Doença neurodegenerativa na família			
Não	12 (92,3)	48 (54,5)	0,01
Sim	1 (7,7)	40 (45,5)	
Complicações			
Não	11 (84,6)	60 (68,2)	0,22
Sim	2 (15,4)	28 (31,8)	
Patologias anteriores			
Não	9 (69,2)	45 (51,1)	0,22
Sim	4 (30,8)	43 (48,9)	
Uso do Riluzol			
Não	2 (15,4)	23 (26,1)	0,40
Sim	11 (84,6)	65 (73,9)	

* Qui-quadrado de Pearson; n = frequência absoluta; % = frequência relative

Além disso, as combinações genotípicas (*GSTM1:GSTT1*) também foram relacionadas às características clínicas e demográficas dos pacientes do grupo caso, revelando uma diferença significativa entre o genótipo duplo presente (+/+) e o histórico familiar de doença

neurodegenerativa ($p=0,02$) (Tabela 5). Assim, verificamos uma maior frequência do genótipo duplo presente no grupo caso, evidenciando novamente que as deleções de *GSTM1* e *GSTT1* não influenciam no desenvolvimento da ELA.

Tabela 5. Associação das possíveis combinações genóticas ao perfil demográfico e clínico de pacientes com ELA.

	<i>Combinações GSTM1/GSTT1</i> n (%)				<i>p</i> *
	-/-	-/+	+/-	+/+	
Sexo					
Feminino	0 (0,0)	22 (55,0)	4 (36,4)	19 (39,6)	0,24
Masculino	2 (100,0)	18 (45,0)	7 (63,6)	29 (60,4)	
Etnia					
Branco	0 (0,0)	21 (52,5)	5 (45,5)	23 (47,9)	0,13
Negro	1 (50,0)	1 (2,5)	2 (18,2)	3 (6,3)	
Pardo	1 (50,0)	18 (45,0)	4 (36,4)	22 (45,8)	
Praticantes de atividade física					
Não	1 (50,0)	23 (57,5)	5 (45,5)	18 (37,5)	0,31
Sim	1 (50,0)	17 (42,5)	6 (54,5)	30 (62,5)	
Exposição ambiental					
Não	1 (50,0)	34 (85,0)	7 (63,6)	30 (62,5)	0,10
Sim	1 (50,0)	6 (15,0)	4 (36,4)	18 (37,5)	
Ingestão de álcool					
Não	1 (50,0)	26 (65,0)	3 (27,3)	25 (52,1)	0,16
Sim	1 (50,0)	14 (35,0)	8 (72,7)	23 (47,9)	
Tabagismo					
Não	2 (100,0)	30 (75,0)	7 (63,6)	26 (54,2)	0,15
Sim	0 (0,0)	10 (25,0)	4 (36,4)	22 (45,8)	
Tipo					
Esporádico	2 (100,0)	36 (90,0)	11 (100,0)	46 (95,8)	0,51
Familiar	0 (0,0)	4 (10,0)	0 (0,0)	2 (4,2)	
Doença neurodegenerativa na família					
Não	2 (100,0)	26 (65,0)	10 (90,9)	22 (45,8)	0,02
Sim	0 (0,0)	14 (35,0)	1 (9,1)	26 (54,2)†	
Complicações					
Não	1 (50,0)	29 (72,5)	10 (90,9)	31 (64,6)	0,32
Sim	1 (50,0)	11 (27,5)	1 (9,1)	17 (35,4)	
Patologias anteriores					
Não	1 (50,0)	22 (55,0)	8 (72,7)	23 (47,9)	0,51
Sim	1 (50,0)	18 (45,0)	3 (27,3)	25 (52,1)	
Uso do Riluzol					
Não	0 (0,0)	8 (20,0)	2 (18,2)	15 (31,3)	0,47
Sim	2 (100,0)	32 (80,0)	9 (81,8)	33 (68,8)	

* Qui-quadrado de Pearson; † Qui-quadrado *post hoc*; n = frequência absoluta; % = frequência relativa.

Nota-se, portanto, que o processo de detoxificação celular é um mecanismo essencial na proteção do corpo contra compostos nocivos, como produtos do estresse oxidativo. Embora o estresse oxidativo desempenhe um papel fundamental na patogênese da ELA, a atuação das GSTs no desenvolvimento da doença permanece incerta. Alterações no estado oxidativo de pacientes com ELA podem refletir a deficiência da enzima SOD, que tem uma relação bem estabelecida com a patogênese da doença (POLLARI et al., 2014; HAYASHI; HOMMA; ICHIJO, 2015).

Pesquisas que busquem a relação entre a ELA e mutações, polimorfismos ou a expressão de outros genes da via de detoxificação celular devem ser incentivadas. Esses estudos fornecerão informações adicionais sobre o papel dos genes atuantes nos mecanismos antioxidantes e de estresse oxidativo na patogênese da doença (D'AMICO et al., 2013; MAZZETTI et al., 2015; KUMAR et al., 2017).

Destaca-se, por fim, a relevância desse estudo. Analisamos uma amostra significativa de pacientes brasileiros, uma população na qual existem poucos estudos sobre essa doença rara. E, apesar dos resultados demonstrarem a não associação da deleção de *GSTM1* e *GSTT1* com o desenvolvimento da ELA, são estudos como esse que fornecem informações valiosas sobre genes possivelmente implicados no desenvolvimento da ELA.

5. CONCLUSÕES

Pode-se concluir por meio das análises realizadas nesse estudo que:

- Houve diferença significativa entre os grupos caso e controle para a variável ingestão de álcool, evidenciando um maior número de indivíduos consumidores de bebidas alcoólicas no grupo caso.

- Não se observou diferença estatística entre os grupos caso e controle para o polimorfismo de deleção em *GSTM1* ou *GSTT1*, isoladamente.

- Não se observou diferenças significativas entre os grupos caso e controle e as possíveis combinações genotípicas.

- Não se constatou a associação entre os polimorfismos de deleção de *GSTM1* e *GSTT1* com a suscetibilidade ao desenvolvimento da ELA.

REFERÊNCIAS

- ABDUL WAHID, S. et al. Cell-based therapies for amyotrophic lateral sclerosis / motor neuron disease (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 11, 2016.
- ABRELA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA. ELA – Esclerose Lateral Amiotrófica. **Livretos – Informativo – Atualização 2013**, 2013.
- ADIBHESAMI, G. et al. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) Polymorphisms and Lung Cancer Risk among a Select Group of Iranian People. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 19, p. 2921–2927, 2018.
- AGNIHOTRI, A., ARUOMA, O.I. Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease: A Nutritional Toxicology Perspective of the Impact of Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, Nutrigenomics and Environmental Chemicals. **J Am Coll Nutr**, v. 12, p. 1-12, 2019.
- AL-CHALABI, A.; HARDIMAN, O. The epidemiology of ALS: A conspiracy of genes, environment and time. **Nature Reviews Neurology**, v. 9, n. 11, p. 617–628, 2013.
- ALLOCATI, N. et al. Glutathione transferases: Substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. **Oncogenesis**, v. 7, n. 1, 2018.
- ALMOSHABEK, H. A.; AL-ASMARI, A. K. Association of glutathione deletion polymorphisms with obesity and their relationship with body mass index , lipoprotein and hypertension among young age Saudis. **Journal of the royal society of medicine cardiovascular disease**, v. 5, p. 1–7, 2016.
- BANATI, R. B., et al. Antibodies against microglia/brain macrophages in the cerebrospinal fluid of a patient with acute amyotrophic lateral sclerosis and presenile dementia. **Clin. Neuropathol.**, v. 14, p. 197–200, 1995.
- BENABDELKRIM, M.; DJEFFAL, O.; BERREDJEM, H. GSTM1 and GSTT1 Polymorphisms and Susceptibility to Prostate Cancer: A Case-Control Study of the Algerian Population. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 19, n. 10, p. 2853–2858, 2018.
- BLASCO, H. et al. Panel of Oxidative Stress and Inflammatory Biomarkers in ALS: A Pilot Study. **Canadian Journal of Neurological Sciences**, v. 44, n. 1, p. 90–95, 2017.
- BLECHER, R. et al. Contact Sports as a Risk Factor for Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review. **Global Spine J.**, v. 9, n. 1, p. 104-118, 2019.
- BOARD, P. G.; MENON, D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3267–3288, 2013.
- BOWERMAN, M. et al. Neuroimmunity dynamics and the development of therapeutic strategies for amyotrophic lateral sclerosis. **Frontiers in Cellular Neuroscience**. v. 7, n. 214,

2013.

BROOKS, B. R. et al. El Escorial revisited: Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. **Amyotrophic Lateral Sclerosis**, v. 1, n. 5, p. 293–299, 2000.

CALVO, A. et al. Influence of cigarette smoking on ALS outcome: a population-based study. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v. 87, n. 11, p. 1229–1233, 2016.

CALZADA, N. et al. Factors predicting survival in amyotrophic lateral sclerosis patients on non-invasive ventilation. **Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.**, v. 17, p. 337–342, 2016.

CARVALHO, C.; MOREIRA, P. I. Oxidative Stress : A Major Player in Cerebrovascular Alterations Associated to Neurodegenerative Events. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. July, p. 1–14, 2018.

CHENG, H. et al. Relationship between GSTM1 / GSTT1 Null Genotypes and Renal Cell Carcinoma Risk : A Meta- Analysis Relationship between GSTM1 / GSTT1 Null Genotypes and Renal Cell Carcinoma Risk : A Meta-Analysis. **Renal Failure**, v. 34, n. 8, p. 1052–1057, 2012.

CHIA, R.; CHIÒ, A.; TRAYNOR, B. J. Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications. **Lancet Neurol.**, v. 17, n. 1, p. 94–102, 2018.

CHIO, A. et al. Global Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis: a Systematic Review of the Published Literature. **Neuroepidemiology**, v. 41, n. 2, p. 118–130, 2013.

CHOUDHURY, J. H. et al. and GSTT1 polymorphisms and their interaction with tobacco exposure influence the risk of head and neck cancer in Northeast Indian population. **Tumor Biol.**, v. 36, n. 8, p. 5773–5783, 2015.

COATTI, G.C.; CAVAÇANA, N.; ZATZ, M. The Role of Pericytes in Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 1147, p. 137–146, 2019.

COSTA, L.G. Overview of Neurotoxicology. **Current Protocols in Toxicology**. v. 74, n. 1, 2017.

CURIONI, O. A. et al. The Influence of Gene Polymorphisms on Tobacco and Alcohol-Induced Oral Cancer Risk. **Journal of Cancer Therapy**, v. 4, n. July, p. 978–988, 2013.

D'AMICO, E. et al. Clinical Perspective of Oxidative Stress in Sporadic ALS. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 6, p. 997–1003, 2013.

DAI, D. et al. Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. **Longevity & Healthspan**, v. 3, n. 1, p. 1–22, 2014.

DARBYSON, A.; NGSEE, J. K. Oxysterol-binding protein ORP3 rescues the Amyotrophic Lateral Sclerosis-linked mutant VAPB phenotype. **Experimental Cell Research**, v. 341, n. 1, p. 18–31, 2016.

DASARI, S. et al. Genetic polymorphism of glutathione S-transferases: Relevance to neurological disorders. **Pathophysiology**, v. 25, n. 4, p. 285–292, dez. 2018a.

DASARI, S. et al. Determination of acrylamide-induced chick embryo brain glutathione S-transferases expression through enzyme activity and western blot. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 43–47, 2018b.

DE LIMA, R. M. et al. Do GST polymorphisms influence in the pathogenesis of diabetic nephropathy? **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 478, p. 10–16, 2018.

DE SILVA, T. M., MILLER, A. A. Cerebral small vessel disease: targeting oxidative stress as a novel therapeutic strategy? **Front. Pharmacol.** v. 7, p. 61, 2016.

DIETRICH-NETO, F. et al. Amyotrophic lateral sclerosis in Brazil: 1998 national survey. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 58, n. 3 A, p. 607–615, 2000.

DOS ANJOS, L. R. B. et al. Impact of Oxidative Changes and Possible Effects of Genetics Polymorphisms of Glutathione S-Transferase in Diabetics Patients with Complications. In: **Glutathione in Health and Disease**. [s.l.] IntechOpen, 2018. p. 47–62.

D'OVIDIO, F. et al. Association between alcohol exposure and the risk of amyotrophic lateral sclerosis in the Euro-MOTOR study. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 90, n. 1, p. 11–19, 2019.

ELFAWY, H. A.; DAS, B. Crosstalk between mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and age related neurodegenerative disease: Etiologies and therapeutic strategies. **Life Sciences**, v. 218, n. December 2018, p. 165–184, 2019.

ESCARRABILL, J. et al. Place of death in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. 20, n. 4, p. 188–193, 2014.

ESLAMI, S.; SAHEBKAR, A. Glutathione-S-transferase M1 and T1 null genotypes are associated with hypertension risk: A systematic review and meta-analysis of 12 studies. **Current Hypertension Reports**, v. 16, n. 6, 2014.

ESPINOSA-DIEZ, C. et al. Redox Biology Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. **Redox Biology**, v. 6, p. 183–197, 2015.

EUM, K.-D. et al. Modification of the association between lead exposure and amyotrophic lateral sclerosis by iron and oxidative stress related gene polymorphisms. **Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration**, v. 16, n. 1–2, p. 72–79, 31 mar. 2015.

FORMAN, H.J., ZHANG, H., RINNA, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Mol Aspects Med.** v. 30, n. 1-2, p. 1–12, 2009.

FUCIARELLI, M. et al. Modulation of the GSTT1 activity by the GSTM1 phenotype in a sample of Italian farm-workers. **Arch. Toxicol.**, v. 83, p. 115–120, 2009.

GHASEMI, M.; BROWN, R. H. Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 5, p. 1–38, 2017.

GIAMPIETRO, R., et al. The Pivotal Role of Copper in Neurodegeneration: A New Strategy for the Therapy of Neurodegenerative Disorders. **Mol Pharm.** v. 15, n. 3, p. 808–820, 2018.

GONZÁLEZ, H., PACHECO, R. T-cell-mediated regulation of neuroinflammation involved in neurodegenerative diseases. **Journal of Neuroinflammation.** v. 11, p. 201, 2014.

GROLLEMUND, V. et al. Machine Learning in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Achievements, Pitfalls, and Future Directions. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, n. February, p. 1–28, 2019.

GUNNARSSON, L.-G.; BODIN, L. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Occupational Exposures: A Systematic Literature Review and Meta-Analyses. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 11, p. 2371, 2018.

HARDIMAN, O. et al. Amyotrophic lateral sclerosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 10107, p. 17071, 5 out. 2017.

HAYASHI, Y.; HOMMA, K.; ICHIJO, H. Advances in Biological Regulation SOD1 in neurotoxicity and its controversial roles in SOD1. **Advances in Biological Regulation**, v. 60, p. 95–104, 2015.

HAYES, J.D., STRANGE, R.C. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. **Pharmacology.** v. 61, n. 3, p. 154-166, 2000.

HERNÁNDEZ, J.A.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, R.C.; RENDÓN-RAMÍREZ, A. Lipids and oxidative stress associated with ethanol-induced neurological damage. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, v. 2016: 1543809, 2016.

HOOTEN, K.G., et al. Protective and Toxic Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Neurotherapeutics.** v. 12, p. 364–375, 2015.

HUISMAN, M.H. et al. Effect of presymptomatic body mass index and consumption of fat and alcohol on amyotrophic lateral sclerosis. **JAMA neurol.**, v. 72, n. 10, p. 1155-1162, 2015.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287–293, 2018.

INGRE, C. et al. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. **Clinical Epidemiology**, v. 7, p. 181–193, 2015.

ISLAM, M. T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. **Neurological Research**, v. 39, n. 1, p. 73–82, 2016.

- JAISSWAL, M. K. Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs. **Medicinal Research Reviews**, v. 39, n. 2, p. 733–748, mar. 2019.
- JL, J.; SUNDQUIST, J.; SUNDQUIST, K. Association of alcohol use disorders with amyotrophic lateral sclerosis: a Swedish national cohort study. **Eur J Neurol**, v. 23, p. 270–275, 2016.
- KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students : Oxidants , antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biology**, v. 1, n. 1, p. 244–257, 2013.
- KAMEL F, et al. Pesticide exposure and amyotrophic lateral sclerosis. **Neurotoxicology**. v. 33, n. 3, p. 457–462, 2012.
- KARKI, P., et al. Genetic Dysregulation of Astrocytic Glutamate Transporter EAAT2 and its Implications in Neurological Disorders and Manganese Toxicity. **Neurochem Res**. v. 40, n. 2, p. 380–388, 2015.
- KASTHURINAIDU, S. P. et al. GST M1-T1 null allele frequency patterns in geographically assorted human populations:A phylogenetic approach. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–19, 2015.
- KIERNAN, M. C. et al. Amyotrophic lateral sclerosis. **Lancet**, v. 377, p. 942–955, 2011.
- KUMAR, A. et al. Role of Glutathione-S-transferases in neurological problems. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, n. 3, p. 299–309, 2017.
- KURUTAS, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative / nitrosative stress : current state. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 71, p. 1–22, 2016.
- LIMA, N. M. F. V.; NUCCI, A. Clinical attention and assistance profile of patients with amyotrophic lateral sclerosis. v. 69, n. 2A, p. 170–175, 2011.
- LINDEN-JUNIOR, E. et al. Prevalence of amyotrophic lateral sclerosis in the city of Porto Alegre , in Southern Brazil. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 71, n. 12, p. 959–962, 2013.
- LITTLE, J. et al. STrengthening the REporting of genetic association studies (STREGA)- An extension of the STROBE statement. **Genetic Epidemiology**, v. 33, n. 7, p. 581–598, , 2009.
- LOGROSCINO, G; PICCININNI, M. Amyotrophic Lateral Sclerosis Descriptive Epidemiology: The Origin of Geographic Difference. **Neuroepidemiology**, v. 52, n. 1-2, p. 93-103, 2019.
- LONGINETTI, E. et al. Neurodegenerative and psychiatric diseases among families with amyotrophic lateral sclerosis. **Neurology**. v. 89, p. 578–585, 2017.
- LUNA, J. et al. Amyotrophic lateral sclerosis mortality rates among ethnic groups in a predominant admixed population in Latin America: a population-based study in Ecuador. **Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.**, v. 20, n. 5-6, p. 404-412, 2019.

- LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, 2014.
- MACDONALD, P.L.; GARDNER, R.C. Type I error rate comparisons of post hoc procedures for I j chi-square tables. **Educ. Psychol. Measur.**, v. 60, n.5, p. 735-754, 2000.
- MALASPINA, A., PUENTES, F., AMOR, S. Disease origin and progression in amyotrophic lateral sclerosis: an immunology perspective. **Int Immunol.** v. 27, n. 3, p. 117-129, 2015.
- MARIN, B. et al. Variation in world wide incidence of amyotrophic lateral sclerosis: A meta-analysis. **International Journal of Epidemiology**, v. 46, n. 1, p. 57–74, 2017.
- MATOS, S. E. DE et al. Mortality rates due to amyotrophic lateral sclerosis in São Paulo City from 2002 to 2006. v. 69, n. 6, p. 861–866, 2011.
- MAZZETTI, A. P. et al. Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. **Neurochemistry International**, v. 82, p. 10–18, 2015.
- MORAES, L; GOLDBAUM, MOISÉS; SILVA, H C A; CALLEGARO, D. Incidence rate of amiotrophic lateral sclerosis (ALS) in São Paulo City, Brazil, 1991-1997. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria. São Paulo: Congresso Brasileiro de Neurologia**, v. 56, p. 343, 1998.
- MOURA, M.C.; CASULARI, L.A.; CARVALHO GARBI NOVAES, M.R. Degeneration Ethnic and demographic incidence of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in Brazil: A population based study. **Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.**,v. 17, n. 3-4, p. 275-281, 2016.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- NICOLAS, A. et al. Genome-wide Analyses Identify KIF5A as a Novel ALS Gene. **Neuron**, v. 97, n. 6, p. 1268-1283, 2018.
- NIEDZIELSKA, E. et al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Molecular Neurobiology**, v. 53, p. 4094–4125, 2016.
- OKAMOTO, K. et al. Lifestyle factors and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a case–control study in Japan. **Ann. Epidemiol.**, v. 19, p. 359-364, 2009.
- OSKARSSON, B.; GENDRON, T. F.; STAFF, N. P. Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Update for 2018. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 93, n. 11, p. 1617–1628, 2018.
- OSKARSSON, B.; HORTON, D. K.; MITSUMOTO, H. Potential Environmental Factors in Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Neurol Clin.**, v. 33, n. 4, p. 877–888, 2015.
- PEJOVIC-MILOVANCEVIC, M. M. et al. Glutathione S-Transferase Deletion Polymorphisms in Early-Onset Psychotic and Bipolar Disorders: A Case-Control Study. **Laboratory Medicine**, v. 47, n. 3, p. 195–204, 2016.

- PINHEIRO, D. S. et al. Evaluation of Glutathione S-Transferase GSTM1 and GSTT1 Deletion Polymorphisms on Type-2 Diabetes Mellitus Risk. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–5, 2013.
- PINHEIRO, D. S. et al. GSTM1/GSTT1 double-null genotype increases risk of treatment-resistant schizophrenia: A genetic association study in Brazilian patients. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. 1–10, 2017.
- POLLARI, E. et al. The role of oxidative stress in degeneration of the neuromuscular junction in amyotrophic lateral sclerosis. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, n. 131, p. 1–8, 2014.
- POPA-WAGNER, A. et al. ROS and Brain Diseases : The Good , the Bad , and the Ugly. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 2013.
- PRADO, L. DE G. R. et al. Amyotrophic lateral sclerosis in Brazil: Case series and review of the Brazilian literature. **Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration**, v. 8421, n. February, p. 1–7, 2016.
- PRADO, L.G.R. et al. Neuroinflamação na esclerose lateral amiotrófica. **Rev Bras Neurol**. v. 54, n. 3, p. 22-27, 2018.
- RAGAGNIN, A.M.G. et al. Motor Neuron Susceptibility in ALS/FTD. **Front Neurosci.**, v. 13, p.532, 2019.
- RECHTMAN, L. et al. Racial and ethnic differences among amyotrophic lateral sclerosis cases in the United States. **Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration**, v. 16, p. 65-71, 2015.
- REIS, A. A. da S. **Estudo da associação do polimorfismo genético em carcinomas da tireóide**. 2010. 96f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- RIANCHO, J. et al. The increasing importance of environmental conditions in amyotrophic lateral sclerosis. **International Journal of Biometeorology**, v. 62, n. 8, p. 1361–1374, 2018.
- ROBBERECHT, W.; PHILIPS, T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. **Nat Rev Neurosci.**, v. 14, n. 4, p. 248-264, 2013.
- ROBERTS, A.L. et al. Race/ethnicity, socioeconomic status, and ALS mortality in the United States. **Neurology**, v. 87, n. 22, p. 2300-2308, 2016.
- ROONEY, J.P.K., et al. A case-control study of hormonal exposures as etiologic factors for ALS in women. **Neurology**, v. 89, p. 1283-1290, 2017.
- SAITOU, M.; ISHIDA, T. Distributions of the GSTM1 and GSTT1 Null Genotypes Worldwide are Characterized by Latitudinal Clines. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 16, n. 1, p. 355–361, 2015.

SALMINEN, L.E.; PAUL, R.H. Oxidative stress and genetic markers of suboptimal antioxidant defense in the aging brain: a theoretical review. **Rev. Neurosci.** v. 25, p. 805–819, 2014.

SHEFA, U. et al. Mitophagy links oxidative stress conditions and neurodegenerative diseases. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 5, p. 749, 2019.

SILANI, V. et al. The diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Arch Ital Biol.**, v. 149, n. 1, p. 5–27, 2011.

SMEYNE, M.; SMEYNE, R. J. Glutathione Metabolism and Parkinson's Disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 13–25, 2013.

SUTHAR, P. C. et al. Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotype frequency distribution among four tribal populations of western India. **Journal of Genetics**, v. 97, n. 1, p. 11–24, 24 mar. 2018.

SWINNEN, B.; ROBBERECHT, W. The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, v. 10, n. 11, p. 661–670, 2014.

TALBOTT, E. O.; MALEK, A. M.; LACOMIS, D. **The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis**. 1. ed., v. 138 [s.l.] Elsevier B.V., 2016.

TARAFDAR, A.; PULA, G. The Role of NADPH Oxidases and Oxidative Stress in Neurodegenerative Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 3824, 2018.

TEAMA, S. DNA Polymorphisms: DNA-Based Molecular Markers and Their Application in Medicine. In: **Genetic Diversity and Disease Susceptibility**. [s.l.] IntechOpen, 2018. p. 25–40.

TEW, K. D. et al. The Role of Glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in Cancer. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 299–313, 2011.

TROJSI, F.; MONSURRÒ, M. R.; TEDESCHI, G. Exposure to environmental toxicants and pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis: State of the art and research perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 8, p. 15286–15311, 2013.

USAREK, E. et al. A Study of Glutathione S-transferase pi Expression in Central Nervous System of Subjects with Amyotrophic Lateral Sclerosis Using RNA Extraction from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Material. **Neurochemical Research**, v. 30, n. 8, p. 1003–1007, 2005.

VAN ES, M.A. et al. Amyotrophic lateral sclerosis. **Lancet**, v. 390, n. 10107, p. 2084–2098, 2017.

VOLKOW, N.D. et al. Alcohol decreases baseline brain glucose metabolism more in heavy

drinkers than controls but has no effect on stimulation-induced metabolic increases. **J. Neurosci.**, v. 35, n. 7, p. 3248-3255, 2015.

VUCIC, S.; ROTHSTEIN, J. D.; KIERNAN, M. C. Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: Insights from pathophysiological studies. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 8, p. 433–442, 2014.

WANG, H. et al. Smoking and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a pooled analysis of 5 prospective cohorts. **Arch. Neurol.**, v. 68, n.2, p. 207-213, 2011.

WANG, A. M. et al. Identification of risk factors associated with onset and progression of amyotrophic lateral sclerosis using systematic review and meta-analysis. **Neurotoxicology**, v. 61, p. 101–130, 2017.

WARD, R.J. et al. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. **Lancet Neurol.**, v. 13, n. 10, p. 1045-1060, 2014.

WEIDUSCHAT, N. et al. Motor cortex glutathione deficit in ALS measured in vivo with the J-editing technique. **Neuroscience Letters**, v. 570, p. 102–107, 2014.

WHITWORTH, A.J., et al. Increased glutathione S-transferase activity rescues dopaminergic neuron loss in a Drosophila model of Parkinson's disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 102, p. 8024–8029, 2005.

WU, B.; DONG, D. Human cytosolic glutathione transferases : structure , function , and drug discovery. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 33, n. 12, p. 656–668, 2012.

XU, D. et al. Null Genotype of GSTT1 Contributes to Colorectal Cancer Risk in Asian Populations : Evidence from a Meta-analysis. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 12, p. 2279–2284, 2011.

YOSHINO, H. Expert Review of Neurotherapeutics Edaravone for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis Edaravone for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 19, n. 3, p. 1–9, 2019.

YU, Y. et al. Environmental risk factors and amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a case-control study of ALS in Michigan. **PLoS One**, v. 9, n.6, 2014.

ZENG, P.; ZHOU, X. Causal effects of blood lipids on amyotrophic lateral sclerosis: a Mendelian randomization study. **Human molecular genetics**, v. 28, n. 4, p. 688–697, 2019.

ZHANG, J. et al. Null genotypes of GSTM1 and GSTT1 contribute to increased risk of diabetes mellitus: A meta-analysis. **Gene**, v. 518, n. 2, p. 405–411, 2013.

ZHAO, W.; BEERS, D.R.; APPEL, S.H. Immune-mediated Mechanisms in the Pathoprogession of Amyotrophic Lateral Sclerosis. **J Neuroimmune Pharmacol.** v. 8, n. 4, p. 888–899, 2013.

ZMORXYNSKI, S. et al. Significance of Polymorphisms and Expression of Enzyme-

Encoding Genes Related to Glutathione in Hematopoietic Cancers and Solid Tumors.
BioMed Research International, v. 2015, 2015.

ANEXOS

Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação clínica e molecular de pacientes portadores de Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) em Centros Médicos Goianos Especializados

Pesquisador: Rodrigo da Silva Santos

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 3

CAAE: 79593117.7.0000.5083

Instituição Proponente: Universidade Federal de Goiás - UFG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.335.568

Apresentação do Projeto:

Trata da solicitação de EMENDA. Título da Pesquisa: Avaliação clínica e molecular de pacientes portadores de Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) em Centros Médicos Goianos Especializados. Pesquisador Responsável: Rodrigo da Silva Santos. N. CAAE: 79593117.7.0000.5083. Membro da Equipe de Pesquisa: ANGELA ADAMSKI DA SILVA; DHIOGO DA CRUZ PEREIRA BENTO. A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa progressiva e de grande impacto, pois afeta os neurônios motores no córtex motor primário, no tronco encefálico nas vias corticoespinhais e também na medula espinhal. Sua incidência na população varia de 0,6 a 2,6 por 100.000 habitantes. Mais de 90% dos casos são esporádicos (ELAS), e o restante apresenta padrão de herança autossômica dominante. Entre os genes associados a ELAS, destacam-se as mutações no gene *sod1*, *tardeb*, *fus*, *c9orf72*, *vapb*, *veg*, *gsts* e genes do ciclo do folato. O uso da análise de perfil genotípico para esses genes candidatos em destaque pode predizer pacientes susceptíveis a ELAS mediante a presença da mutação e consequentemente, estes se beneficiariam de uma medicina personalizada prevenindo a doença mediante a incorporação de biotecnologias associadas a edição do genoma, terapia gênica e celular, e novas diretrizes poderão ser incorporadas no Protocolo Clínico e Diretrizes de Terapêutica (PCDT) definidas pelo Ministério da Saúde/SUS.

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação - Agência UFG de Inovação, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2
Bairro: Campus Samambaia, UFG **CEP:** 74.890-970
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.ppi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.335.568

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avaliar o perfil genotípico e a frequência de mutações de variantes genéticas em pacientes portadores de ELA, atendidos pelo SUS, através de um estudo transversal de base hospitalar em centros médicos especializados do Estado de Goiás.

Objetivo Secundário:

- Investigar o perfil genotípico de mutações nos genes *sod1*, *tardebp*, *fus*, *c9orf72*, *vapb*, *vegf*, *gsts* e genes do ciclo do folato em pacientes portadores de ELA e a susceptibilidade genética ao desenvolvimento de ELA;
- Avaliar e comparar as frequências das mutações associadas aos genes *sod1*, *tardebp*, *fus*, *c9orf72*, *vapb*, *vegf*, *gsts* e genes do ciclo do folato na classificação de ELA (ELAF e ELAS) e associando ao sexo e faixa etária dos pacientes portadores de ELA no estudo;
- Associar as frequências das mutações para estratégia de novas diretrizes no SUS quanto à susceptibilidade e condução na terapêutica da ELA, e determinar a prevalência de ELA na população do Estado de Goiás;
- Realizar um estudo de custo-efetividade visando a incorporação de testes genéticos para pacientes com ELA, contribuindo nas estratégias de planejamento de custo do SUS nas políticas públicas para doenças crônicas raras.
- Construção de um painel clínico com imagens de pacientes (após a devida autorização do mesmo e/ou responsável) evidenciando os fenótipos característicos e provocados nos mesmos, pela progressão da doença em estudo. A identidade do sujeito será preservada nas imagens.
- Contribuir para formação de recursos humanos qualificados para a área de genética humana e médica e ciências da saúde.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não houve alteração do desenho originalmente protocolado, somente solicitam a extensão do cronograma. Os riscos e benefícios foram analisados em parecer anteriormente emitido.

Os riscos e benefícios citados pelo pesquisador são, a saber:

Riscos:

*Os procedimentos da pesquisa oferecem risco mínimo de ocorrência de algum dano imediato ou

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação - Agência UFG de Inovação, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2
 Bairro: Campus Samambaia, UFG CEP: 74.690-970
 UF: GO Município: GOIANIA
 Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.335.568

tardio para o participante. Poderão ocorrer hematomas locais a pós a coleta de sangue. Além disso, há o risco de infecção no processo de punção de venosa. Porém, todo material perfuro cortante a ser utilizado no projeto será descartável, por conseguinte sem nenhum risco de transmissibilidade de doenças infecto-contagiosa. Outro risco é a perda de sigilo e confidencialidade, mas com a finalidade de minimizar este risco os pesquisadores irão tratar a identidade dos participantes com padrões profissionais de sigilo e as informações colhidas serão utilizadas somente para fins científicos. Os resultados da pesquisa serão entregues para os participantes e permanecerão confidenciais".

Benefícios:

Os participantes desta pesquisa não terão nenhum benefício direto. Entretanto, espera-se que este estudo traga informações importantes sobre às complicações do Esclerose Lateral Amiotrófica, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa auxiliar no diagnóstico precoce de outros pacientes."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Justificativa da Emenda:

"Eu, Prof. Dr. Rodrigo da Silva Santos (Líder do Grupo de Pesquisa em Patologia Molecular - CNPq/UFG), solicito ao CEP/UFG, a prorrogação do período de execução do projeto de pesquisa em questão, intitulado: "Avaliação clínica e molecular de pacientes portadores de Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) em Centros Médicos Goianos Especializados". O projeto estava previsto para ser finalizado em 30/01/2019, porém não foi possível em função de alguns fatores, são eles: (I) Por se tratar de uma doença rara, encontramos dificuldades em completar o "n" de 100 pacientes prometido no protocolo e atualmente exigido para publicação em revistas internacionais de impacto. Além disso, com um número maior de pacientes, poderemos elaborar conclusões mais consistentes e reais, a partir dos resultados obtidos com abordagens moleculares. Finalizaremos as coletas nos próximos dois meses, porém ocorrerá um atraso nas análises genéticas.

(II) As primeiras análises genéticas revelaram aspectos positivos e cientificamente interessantes, que até então eram desconhecidos na literatura da área do estudo, e que nos instigou a realizar

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação - Agência UFG de Inovação, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2
 Bairro: Campus Samambaia, UFG CEP: 74.690-970
 UF: GO Município: GOIANIA
 Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.335.568

novas abordagens antes das publicações dos dados, e que portanto, irá nos fazer gastar mais tempo, do que o planejado inicialmente.

(III) O projeto de pesquisa tomou uma proporção muito maior que o esperado, e hoje é objeto de investigação de várias dissertações e teses do meu grupo de pesquisa, e assim necessitaremos de um prazo maior para a conclusão dos objetivos propostos inicialmente e publicação de todos os dados em revistas de impacto internacional. Em função do exposto, solicito a prorrogação desse protocolo para 30/12/2024. Um novo cronograma adaptado foi anexado aos documentos da plataforma."

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Arquivo da Informações Básicas com as devidas justificativas da solicitação da emenda.
- Cronograma atualizado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise dos documentos postados somos favoráveis à aprovação da presente EMENDA que solicita extensão do cronograma para 30 de dezembro de 2024.

Considerações Finais a critério do CEP:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UFG considera a presente EMENDA APROVADA. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Resolução CNS n. 466/12. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_134466_3_E1.pdf	27/04/2019 21:35:12		Aceito
Outros	Cronograma_da_Pesquisa_NOVO_2019.pdf	27/04/2019 21:03:50	Rodrigo da Silva Santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_completo_ELA.pdf	11/01/2018 17:58:25	Rodrigo da Silva Santos	Aceito

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação - Agência UFG de Inovação, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2
 Bairro: Campus Samambaia, UFG CEP: 74.690-970
 UF: GO Município: GOIANIA
 Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.335.568

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ELA.pdf	11/01/2018 17:57:52	Rodrigo da Silva Santos	Aceito
Outros	Termo_de_Responsabilidade_Compromisso.pdf	11/01/2018 17:57:18	Rodrigo da Silva Santos	Aceito
Outros	Carta_de_Encaminhamento_Pendencia.s.pdf	11/01/2018 17:55:43	Rodrigo da Silva Santos	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	28/10/2017 19:22:11	Rodrigo da Silva Santos	Aceito
Outros	Declaracao_de_coleta_de_dados.pdf	28/10/2017 19:21:43	Rodrigo da Silva Santos	Aceito
Outros	Questionario_ELA.pdf	20/10/2017 19:06:35	Rodrigo da Silva Santos	Aceito
Outros	Termo_de_anuencia.pdf	20/10/2017 19:04:10	Rodrigo da Silva Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_compromisso.pdf	20/10/2017 19:02:56	Rodrigo da Silva Santos	Aceito
Cronograma	Cronograma_da_Pesquisa.pdf	20/10/2017 19:01:47	Rodrigo da Silva Santos	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

GOIANIA, 20 de Maio de 2019

**Assinado por:
Geisa Mozzer
(Coordenador(a))**

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação - Agência UFG de Inovação, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2
 Bairro: Campus Samambaia, UFG CEP: 74.690-970
 UF: GO Município: GOIANIA
 Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com

Anexo 2. Página de submissão do Manuscrito ao periódico Molecular and Cellular Neuroscience (ISSN: 1044-7431). Submetido em: 17/02/2020.

Manuscript Details

Manuscript number	YMCNE_2020_43
Title	No association between GSTM1 and GSTT1 deletion polymorphisms and Amyotrophic Lateral Sclerosis: a genetic study in Brazilian patients
Article type	Research Paper

Abstract

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease that affects motor neurons, leading to progressive muscle atrophy. Studies have suggested that genetic factors and oxidative stress are involved in neurodegeneration. The GSTM1 and GSTT1 genes of the glutathione S-transferases superfamily (GSTs) act on the detoxification process of xenobiotics and oxidative stress products. Their complete deletion polymorphisms are detrimental to this protection mechanism. This case-control study evaluated the association of these polymorphisms with the risk of developing ALS. We genotyped 101 case-patients and 119 controls with multiplex real-time PCR (qPCR) and collected clinical and demographic data from medical records and questionnaires. Our findings demonstrated that alcohol consumption was predominant in ALS patients and was significantly associated with the development of the disease ($p=0.01$). However, we found no association between ALS risk and GSTM1 ($p=0.85$) and GSTT1 ($p=0.90$) polymorphisms, even when we combined both genotypes. Further studies may clarify the relationship between the GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and the development of ALS as well as provide insights on the pathogenesis of the disease.

Keywords	Amyotrophic Lateral Sclerosis; Motor Neuron Disease; Oxidative stress; Glutathione S-transferase; Polymorphism.
Corresponding Author	Angela Adamski
Order of Authors	Kamilla de Faria Santos, Romulo Morais Azevedo, Dhiogo da Cruz Pereira Bento, Rodrigo da Silva Santos, Angela Adamski

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Cover letter Santos et al 2020_1.pdf [Cover Letter]

Highlights- Article Santos et al. 2020.docx [Highlights]

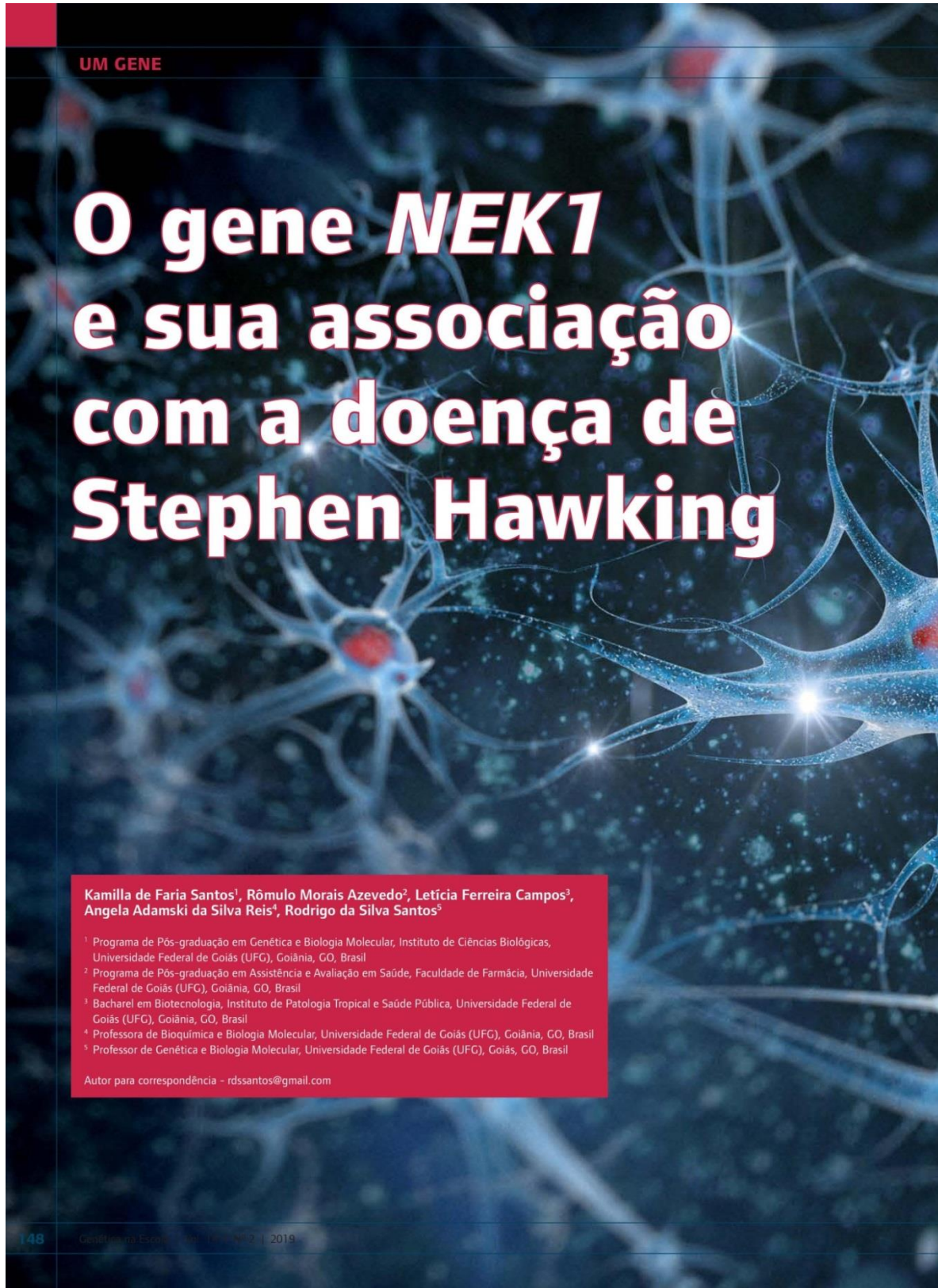
Abstract Santos et al 2020_1.docx [Abstract]

Article Santos et al 2020-1.docx [Manuscript File]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

Anexo 3. Demais trabalhos desenvolvidos durante o mestrado

- Artigo publicado na revista Genética na Escola (ISSN: 1980-3540)



Patogênese: é o modo ou mecanismo pelo qual se originam as doenças. O estudo dos mecanismos celulares, bioquímicos e teciduais associados à doença é que deve ser descrito como sendo a patologia.

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa progressiva, rara e fatal, que leva à atrofia dos músculos comprometendo a capacidade funcional e motora dos acometidos. A doença ganhou destaque após o diagnóstico do famoso físico Stephen Hawking, já falecido, que foi acometido pela síndrome. A síndrome também ficou conhecida por meio das redes sociais com o chamado “Desafio do Balde de Gelo” que visava o financiamento de pesquisas genéticas sobre a doença. Diversos estudos estão sendo realizados, buscando relacionar alterações genéticas à **patogênese** da ELA. Vários genes, como *SOD1*, *C9ORF72*, *VAPB*, *FUS* e *NEK1* já foram identificados e relacionados com tal esclerose. O foco desse artigo é o gene *NEK1* e sua possível associação com o desenvolvimento da ELA, pois é um dos genes mais recentemente descritos como associados à doença e um elemento-chave nas primeiras vias de reparação de danos no DNA.

UM GENE

ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), também conhecida como “Doença de Lou Gehrig” ou “Doença de Charcot”, é considerada o tipo mais frequente de doença do **neurônio motor**. Esse tipo de enfermidade causa lesões que comprometem as células do cérebro e da medula espinhal, responsáveis por enviar impulsos elétricos (“mensagens”) para os músculos de contração voluntária. Quando esse grupo de células é acometido e se degenera, como acontece na ELA, o indivíduo sofre uma paralisia muscular progressiva, que compromete sua capacidade funcional e motora. Trata-se de uma doença silenciosa e de rápido avanço e acredita-se que, quando surgem os primeiros sintomas, mais de 80% dos neurônios já tenham sido afetados.

Cerca de 90% dos casos de ELA são classificados como esporádicos (ELAS), que ocorrem isolados na família e sem uma causa definida, e 10% representam casos em que há recorrência familiar da doença. Quando **hereditária**, é denominada ELAF. A sobrevida média dos pacientes com ELA é de aproximadamente 3 a 5 anos após o início dos sintomas, que surgem geralmente após os 57 anos, apesar de se observar que 4 a 6% dos pacientes portadores da doença têm idade inferior a 40 anos. Portanto, a ELA é uma doença progressiva com alto índice de mortalidade, devido à falta de conhecimento sobre sua **etiologia** e diagnóstico precoce bem como de tratamento efetivo.

Os principais sintomas relatados são fraqueza e tremores musculares, perda da fala e da capacidade de deglutir, além da insuficiência respiratória, sendo essa a principal causa de morte pela doença. Em sua maioria, os indivíduos afetados pela doença não perdem as funções cognitivas e sensoriais, visto que os neurônios responsáveis por essas capacidades não são afetados.

A história do brilhante físico e cientista Stephen Hawking, cuja obra está relacionada ao estudo da teoria da relatividade, confirma a integridade dos neurônios reguladores das funções cognitivas em portadores da doença.

Hawking foi diagnosticado com ELA aos 21 anos, apresentando, provavelmente, a forma esporádica e juvenil da doença e nunca foi divulgado publicamente qual seria o gene associado ao seu caso. No entanto, superou notavelmente a expectativa de vida prevista para a doença. O filme “A Teoria de Tudo” (*The Theory of Everything*) lançado em janeiro de 2015, conta a história do cientista, reforça o seu reconhecimento mundial, assim como divulga a doença, retratando a vida dos pacientes. O filme destaca que, mesmo com dificuldades, o afetado pela síndrome pode continuar a desenvolver trabalho intelectual.

Diversos fatores estão sendo associados à patogênese da ELA, levando a crer em uma etiologia complexa e multifatorial da doença, são eles: transporte axonal ineficiente, **excitotoxicidade** pelo glutamato, alteração mitocondrial, estresse oxidativo, exposição à **xenobióticos**, **mutações** genéticas, entre outros. O estudo desses fenômenos biológicos permite relacionar o desenvolvimento da ELA a fatores ambientais e genéticos.

Pesquisas genéticas e moleculares foram realizadas, principalmente a partir dos anos 90, para identificar possíveis genes associados à patogênese da ELA. Em 1993, cientistas com o apoio do Instituto Nacional de Distúrbios Neurológicos e Derrame (NINDS) relacionaram a mutação no gene *SOD1* com casos de ELAF, em uma porcentagem de 12-20% dos casos. O *SOD1* codifica a enzima superóxido dismutase, participante dos processos de detoxificação celular, atuando principalmente na transformação do íon superóxido em água + peróxido de hidrogênio.

A partir dessas pesquisas, dezenas de mutações foram identificadas, em vários genes diferentes, que foram relacionadas à doença, cada uma contribuindo para o conhecimento sobre possíveis mecanismos fisiopatológicos da ELA. Em 2004, um grupo de geneticistas brasileiros, pioneiros no estudo da ELA no país, liderado pela Dra. Mayana Zatz, coordenadora do Centro de Estudos do Genoma Humano e de Células-Tronco (CEGH-CEL) da Universidade de São Paulo (USP), associaram mutações no gene *VAPB* ao desenvolvimento da doença. Esse gene codifica a proteína *VAPB* (*Vesicle-associated membrane*

Neurônio motor - Célula especializada do sistema nervoso, responsável por transmitir impulsos elétricos do Sistema Nervoso Central para desencadear a atividade muscular, entre outros processos.

Excitotoxicidade - Processo patológico por meio do qual ocorre a morte ou o dano às células nervosas por estimulação excessiva por neurotransmissores, como o glutamato.

Xenobióticos - São compostos químicos exógenos estranhos ao organismo humano.

Mutações - Processo que provoca alterações na sequência de nucleotídeos do DNA.

Hereditariedade - transmissão entre as gerações de características genéticas de uma espécie.

Etiologia - causas e origens de um determinado fenômeno.



Koca Vebli / Shutterstock.com

protein-associated protein B/C), assim denominada pela sua ligação a uma proteína encontrada na membrana de vesículas secretoras.

Em 2011, outra descoberta significativa foi realizada, por pesquisadores que encontraram um defeito no gene *C9ORF72*, atuante no processamento de RNA, em pacientes portadores de ELA e de demência fronto temporal (DFT), fornecendo evidências de um possível mecanismo de origem semelhante entre os dois distúrbios. Os defeitos no gene *C9ORF72* foram relacionados a 25-40% dos casos de ELAF e a uma pequena fração dos casos de ELAS.

Inicialmente, os estudos concentraram-se no estudo das mutações do gene *SOD1*, tornando-se este o gene mais extensivamente investigado, porém, os estudos têm avançado na pesquisa de mutações nos genes *VAPB*, *C9ORF72*, *TARDP*, *FUS*, *PFN1*, *TUBA4A*, *UBQLN2*, *KIF5A*, *NEK1*, dentre outros. Em 2014, os pesquisadores do Projeto MinE, financiado pela *Amyotrophic Lateral Sclerosis Association (ALS Association)*, sequenciaram o genoma de mais de 15 mil pacientes com ELA e publicaram em 2016 um estudo associando o gene *NEK1* à patogênese da doença.

Em 2018, o mesmo grupo identificou um novo gene possivelmente relacionado com o

desenvolvimento da ELA, o *KIF5A*. A atuação do *KIF5A* ocorre dentro dos neurônios, como parte de um complexo, realizando o transporte de proteínas e organelas intracelulares, incluindo as mitocôndrias. A mutação neste gene faz com que a proteína *KIF5A* seja incompleta, o que causa a falha no mecanismo de transporte. Assim, as pesquisas sugerem uma possível relação da doença com diversos defeitos celulares, a depender de mutações genéticas, com a morte do neurônio motor, incluindo o processamento de RNA, a reciclagem de proteínas, alterações estruturais nos neurônios motores, bem como processos inflamatórios e lesões no DNA. Destaca-se assim, a relevância de estudos genéticos e moleculares que buscam biomarcadores de susceptibilidade à ELA e visam contribuir para a melhora do diagnóstico e do desenvolvimento de possíveis terapias personalizadas e de precisão.

NOVAS DESCOBERTAS: GENE *NEK1* E SUA POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM A ELA

A relevância da ELA motivou uma campanha que ficou conhecida como o “Desafio do balde de gelo” (*Ice Bucket Challenge*), difundida pelas principais redes sociais, nas quais várias personalidades eram desafiadas a jogar um balde de água gelada sobre a cabeça. Essa campanha conscientizava as pessoas sobre a doença e pedia doações à *ALS Association*, uma associação norte-americana que financia estudos sobre ELA e representa pessoas com esta e com outros tipos de doenças neuromotoras degenerativas.

A campanha arrecadou dinheiro suficiente para ajudar a financiar uma nova e grande pesquisa anteriormente mencionada, o Projeto MinE. Tal projeto foi desenvolvido por mais de 80 pesquisadores em 11 países e sequenciou o genoma de mais de 15 mil pessoas com ELA em outubro de 2014, identificando mais um gene relacionado à doença, o *NEK1*. O resultado da pesquisa foi publicado pela revista *Nature Genetics* em 2016.

O gene *NEK1* (*never in mitosis gene A-related kinase 1*), gene A da quinase 1 relacionada ao **NIMA**, localizado no braço longo do

NIMA – do inglês *never in mitosis gene A* (Nunca em mitose). Gene que codifica uma quinase que controla o início da mitose no momento da verificação dos danos ao DNA, que ocorre na passagem da fase G2 para a mitose. A proteína quinase, codificada pelo gene mutado, possui uma substituição de serina por treonina, o que acarreta na parada do ciclo celular, não permitindo que as células entrem em mitose.

UM GENE

Mitose - é o processo de divisão celular pelo qual uma célula eucarionte dá origem a duas células-filhas cromossômica e geneticamente idênticas, em sequência ordenada de etapas.

Ciliogênese - Formação de cílios e flagelos.

cromossomo 4 (4q33) nos seres humanos, contem 38 éxons e 219,35 kb (Figura 1). Representa um dos 11 membros da família de NIMA-quinases altamente conservadas, e que codificam proteínas multifuncionais com variações de 123 a 1286 aminoácidos, envolvidas na regulação e progressão do ciclo celular, **mitose**, **ciliogênese**, permeabilidade da membrana mitocondrial e no reparo ao dano na dupla fita de DNA. Consequentemente, células que não possuem *NEK1* não conseguem reparar DNA, levando a quebras nos **cromossomos** e à instabilidade no **genoma**.

Cromossomos - Cada um dos cromossomos é formado por uma única e longa molécula de DNA que contem vários genes; os cromossomos são os responsáveis por carregar a informação genética que as células e os organismos necessitam para seu crescimento, desenvolvimento e reprodução.

Genoma - é a sequência de nucleotídeos de DNA correspondente a um lote haploide de cromossomos de um organismo.

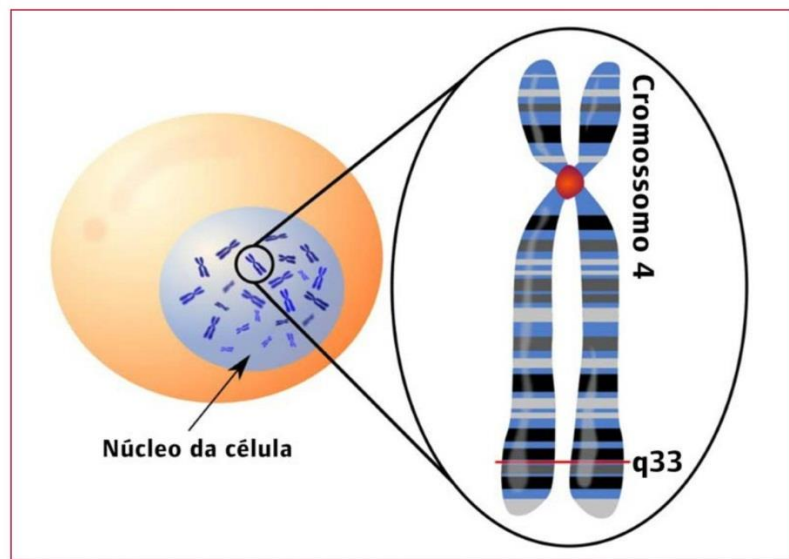


Figura 1. Representação esquemática da posição do gene *NEK1*, localizado no braço longo do cromossomo 4 humano, região 3, banda 3.

Quinases - termo que se refere a todas as enzimas que realizam a transferência do grupamento fosfato de um substrato doador, em geral ATP (adenosina trifosfato), para um substrato receptor, como pequenas moléculas, lipídeos ou proteínas. Essa transferência é fundamental em muitos aspectos do metabolismo, da regulação gênica e da transmissão de sinais na célula.

Fenótipo - É o conjunto de características do indivíduo resultante da interação do **genótipo** com o meio ambiente.

Genótipo - (conjunto de genes recebidos do pai e da mãe).

Estudos mostram que a mutação ou o silenciamento do gene *NEK1* induzem a defeitos no **fuso mitótico**, **segregação** anormal dos cromossomos, parada da mitose e **apoptose** celular. Além disso, os danos causados ao DNA podem se acumular e causar morte celular neuronal. Em suma, proteínas **quinases**, como as NEKs, são guardiãs da integridade genômica.

Mutações em genes relacionados ao reparo de DNA causam **fenótipos** neurológicos de início precoce e evidências sugerem que o reparo ineficiente do DNA pode favorecer a **neurodegeneração** tardia e o envelhecimento cerebral em geral. Dessa forma, foram observados altos níveis de danos oxidativos e quebras no DNA em casos de ELA, doença de Alzheimer e doença de Parkinson.

As mutações relacionadas à ELA ocorrem em diversos genes, principalmente os envolvidos na manutenção da estabilidade do genoma e nos mecanismos de reparo do DNA. Como exemplo, temos mutações em genes como *FUS* e *C9ORF72*, já associados à ELA e que causam danos aumentados no DNA, sendo o último o mais frequentemente associado à doença.

Fuso mitótico - É uma estrutura das células eucariotas que orienta a correta divisão dos cromossomos no processo de mitose.

Apoptose - É uma forma de morte celular programada.

Neurodegeneração - Perda progressiva da estrutura ou funcionamento dos neurônios, incluindo a morte dessas células.

Portanto, nota-se a relação da mutação de perda de função em *NEK1* com a susceptibilidade a ELA, sendo tal gene um elemento-chave nas primeiras vias de reparação de danos no DNA, bem como na alteração da via de reparo já ter sido associada com a fatal neurodegeneração. Adicionalmente, o gene *NEK1* demonstrou interagir com outras proteínas de importância potencial, incluindo algumas previamente associadas à ELA, como a *ALS2* e *VAPB*. No reparo do dano ao DNA, mostrou interagir com o gene *C21ORF2*, também relacionado recentemente ao risco de tal esclerose.

Assim, pesquisas que buscam biomarcadores para a susceptibilidade à ELA têm sido impulsionadas pela crescente compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à doença e espera-se um avanço na identificação de genes associados a tal patogênese. Contudo, são necessárias mais investigações para um melhor entendimento sobre os defeitos moleculares que levam precisamente à degeneração dos neurônios motores.

AFINAL, O QUE SE SABE?

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença neurológica progressiva, caracterizada pela rápida degeneração dos neurônios motores, responsáveis pelo movimento voluntário. A com compreensão, ainda limitada sobre sua etiologia, dificulta a definição de tratamentos efetivos e que tenham tido sua eficácia confirmada, fazendo com que os pesquisadores vejam então, com os estudos genéticos, uma promissora e potencialmente benéfica contribuição para a busca de uma terapêutica personalizada e mais eficaz.

Diversos genes foram associados à ELA, como *SOD1*, *FUS*, *VAPB*, *C9ORF72*, dentre outros, porém o presente trabalho destacou o papel do gene *NEK1*, recentemente associado à doença, que codifica uma proteína quinase envolvida na regulação do ciclo celular e no reparo ao dano no DNA. O produto do gene *NEK1* é um elemento-chave nas primeiras vias de reparação de danos no DNA, e a alteração dessa via já foi relacionada com a neurodegeneração. Esses fatos explicam como a mutação nesse gene pode ser associada ao desenvolvimento da ELA.

Sendo assim, destaca-se a importância e relevância de estudos genômicos que buscam identificar possíveis genes associados à ELA, pois eles podem contribuir para a melhoria e para o desenvolvimento de terapias, bem como para a precisão do diagnóstico e para a compreensão dos mecanismos complexos relacionados a essa doença.

PARA SABER MAIS

- CHEN, Y.; CHEN, C.F.; RILEY, D.J.; CHEN, P.L. Nek1 kinase functions in DNA damage response and checkpoint control through a pathway independent of ATM and ATR. *Cell Cycle*, v. 10, n. 4, p. 655–663, 2011.
- COPPEDÈ, F.; MIGLIORE, L. DNA damage in neurodegenerative diseases. *Mutation Research*, v. 776, p. 84–97, 2015.
- ESCARRABILL, J.; VIANELLO, A.; FARRERO, E.; AMBROSINO, N.; LLORENS, J.M.; VITACCA, M. Place of death in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, v. 20, n. 4, p. 188–193, 2014.
- HIGELIN, J.; CATANESE, A.; SEMELINK-SEDLACEK, L.L.; OEZTUERK, S.; LUTZ, A.K.; BAUSINGER, J.; BARBI, G.; SPEIT, G.; ANDERSEN, P.M.; LUDOLPH, A.C.; DEMESTRE, M.; BOECKERS, T.M. *NEK1* loss-of-function mutation induces DNA damage accumulation in ALS patient-derived motor neurons. *Stem Cell Research*, v. 30, p. 150-162, 2018.
- KENNA, K.P. et al. *NEK1* variants confer susceptibility to amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Genetics*, v. 48, n. 9, p. 1037-1042, 2016.
- NICOLAS, A. et al. Genome-wide Analyses Identify *KIF5A* as a Novel ALS Gene. *Neuron*, v. 97, n. 6, p. 1268–1283, 2018.
- NINDS. National Institute of Neurological Disorders and Stroke. (2013). *Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) Fact Sheet*. Disponível em: <<https://www.ninds.nih.gov/disorders/patient-caregiver-education/fact-sheets/amyotrophic-lateral-sclerosis-als-fact-sheet#causes>>. Acesso em: 08/07/2019.
- NISHIMURA, A.L.; MITNE-NETO, M.; SILVA, H.C.A.; RICHIERI-COSTA, A.; MIDDLETON, S.; CASCIO, D.; KOK, F.; OLIVEIRA, J.R.M.; GILLINGWATER, T.; WEBB, J.; SKEHEL, P.; ZATZ, M. A mutation in the Vesicle-Trafficking Protein *VAPB* causes late-onset spinal muscular atrophy and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *American Journal of Human Genetics*, v. 75, p. 822-831, 2004.
- VAN RHEENEN, W. et al. Genome-wide association analyses identify new risk variants and the genetic architecture of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Genetics*, v.48, n. 9, p.1043-1048, 2016.

- E-book Medicina Genômica (ISBN: 978-85-400-2673-5)

medicina GENÔMICA

Profa. Dra. Angela Adamski da Silva Reis
Prof. Dr. Rodrigo da Silva Santos
(ORGANIZADORES)



Realização:
Grupo de Pesquisa em Patologia Molecular
(Universidade Federal de Goiás - UFG)



ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA: UMA ABORDAGEM NEUROGENÉTICA E A RELAÇÃO COM AS CÉLULAS TRONCO

Dhiogo da Cruz Pereira Bento^{[a](ver nota)}; Kamilla de Faria Santos^{[b](ver nota)}; Yves Mauro Fernandes Ternes^{[c](ver nota)}; Angela Adamski da Silva Reis^{[d](ver nota)}; Rodrigo da Silva Santos^{[e](ver nota)}

RESUMO

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa, de caráter progressivo e fatal, e é caracterizada pela perda de neurônios motores na medula espinhal, no tronco encefálico e no córtex motor primário. Aproximadamente 90% dos casos de ELA são classificados como esporádicos (ELAS) e o restante apresenta padrão de herança autossômica dominante, sendo considerado de origem familiar (ELAF). É a terceira doença neurodegenerativa mais comum no mundo ocidental e, até o momento, não há tratamento e nem terapia que seja eficaz para impedir o seu avanço. A falta de tratamentos eficazes fornece subsídio para a pesquisa genética e molecular sobre os mecanismos subjacentes da ELA, para analisar o processo da doença a nível celular.

a Laboratório de Patologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas (ICB II), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil. Centro Estadual de Reabilitação e Readaptação Dr. Henrique Santillo (CRER). [\(voltar\)](#)

b Laboratório de Patologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas (ICB II), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil. [\(voltar\)](#)

c Departamento de Saúde Coletiva, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil. [\(voltar\)](#)

d Laboratório de Patologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas (ICB II), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas (ICB II), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil. [\(voltar\)](#)

e Laboratório de Patologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas (ICB II), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil. Colegiado de Ciências da Natureza (LEdoC), Unidade Acadêmica Especial de Ciências Humanas, Universidade Federal de Goiás, Goiás, GO, Brasil. [\(voltar\)](#)

Somente em 2014, 22 genes foram envolvidos na patogênese da ELA, e mutações nesses genes representam cerca de dois terços dos casos de ELAF e aproximadamente 10% dos casos de ELAS. Além disso, com o intuito de encontrar um tratamento efetivo para a ELA, várias pesquisas com células-tronco vêm sendo realizadas, devido ao seu potencial de diferenciação em diversos tipos celulares. Dessa forma, o enfoque desta revisão é abordar os conhecimentos referentes à ELA, trazer uma abordagem neurogenética da ELA, apresentando os principais genes já relacionados à patologia, bem como realizar um levantamento dos principais estudos que avaliaram o uso das células-tronco (CT) como tratamento da doença.

Palavras-chave: ELA. Inovação terapêutica. Transplante de CT.

INTRODUÇÃO

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é o tipo mais frequente de doença do neurônio motor, tendo caráter progressivo e fatal. Dois tipos de neurônios motores são afetados na ELA: o neurônio motor superior (NMS), também chamado de primeiro neurônio por estar localizado na área motora do cérebro e o neurônio motor inferior (NMI) ou segundo neurônio, que está localizado no tronco cerebral e na porção anterior da medula espinhal. É caracterizada pela perda de neurônios motores na medula espinhal, no tronco encefálico e no córtex motor primário. Acredita-se que, no mínimo, 80% dos neurônios motores já tenham sido afetados quando surgem os primeiros sintomas.⁽¹⁾

Aproximadamente 90% dos casos de ELA são classificados como esporádicos (ELAS) e o restante apresenta padrão de herança autossômica dominante, sendo considerado de origem familiar (ELAF). Na manifestação familiar, há 50% de chance de cada descendente herdar a mutação no gene e desenvolver a doença. A ELA é a terceira doença neurodegenerativa mais comum no mundo ocidental⁽²⁾ e até o

momento, não há tratamento e nem terapia que seja eficaz para impedir o seu avanço.⁽³⁾

De acordo com os sinais e sintomas apresentados pelo paciente, a caracterização da forma da doença possibilita que o diagnóstico clínico seja mais preciso. A maioria dos casos são considerados de forma clássica quando apresentam como sintomas iniciais: fraqueza muscular distal ou proximal (menos frequente) em membros superiores e inferiores, fasciculações e atrofia. Quando o acometimento do neurônio motor é iniciado no tronco encefálico, a forma da ELA é chamada de bulbar e apresenta manifestações sintomáticas como disartria, disfagia e disfonia.⁽⁴⁾

A perda dos neurônios pela doença, leva à atrofia muscular, fraqueza, fasciculações, espasticidade e insuficiência respiratória.⁽⁵⁾ Com a progressão da doença, os pacientes podem desenvolver sintomas como “espasmos flexores” ou clônus (movimentos involuntários provocados pela ativação do arco reflexo em um membro espástico), contraturas e rigidez muscular, seguido de deformidades articulares. A insuficiência respiratória ou hipoventilação pulmonar é a principal causa de morte, em aproximadamente dois a três anos após o início dos sintomas, surge inicialmente durante o sono apresentando dispnéia, ortopnéia, sonolência excessiva durante o dia, concentração reduzida, dores de cabeça, irritabilidade e alteração do humor.⁽⁴⁾

A incidência da ELA varia entre regiões geográficas, havendo discrepância entre populações. Na década de 1990, foi relatado na América do Norte e na Europa cerca de 1,5 a 2,7 casos a cada 100 mil habitantes/ano.^(4,6) Na Ilha de Guam, Nova Guiné ocidental e na Península de Kii no Japão, onde existe a maior incidência registrada até o momento, a incidência é de 3,9/100 mil habitantes.⁽⁷⁾ Enquanto, no Brasil, a incidência em 2009 era de 1,5 casos/100.000 habitantes, apresentando um total de 2.500 novos casos por ano.⁽⁸⁾

A prevalência é de aproximadamente 2,4 a 7,4 casos por 100 mil habitantes nos países ocidentais.⁽⁶⁾ A taxa de mortalidade mundial, em

decorrência da ELA, ainda não está definida. E a média de idade de acometimento pela doença, no Brasil, é de aproximadamente 54 anos, esse número é baixo quando comparado a média de idade de países europeus e da América do Norte, que varia de 55 a 75 anos.⁽⁹⁾ A ELA geralmente é fatal, levando o indivíduo acometido à morte em 2 a 3 anos após o início dos sintomas. Estudos descrevem que existe predomínio do sexo masculino, com uma razão M:F de 1,5:1, embora dados mais recentes demonstrem que essa razão possa estar próxima da igualdade.⁽⁴⁾

Abordagem Neurogenética

Os avanços significativos feitos em tecnologias genômicas nos últimos anos e o crescimento explosivo no uso de estudos de expressão gênica em todo o genoma para analisar informações moleculares de pacientes transformaram o campo da medicina de precisão. Esses avanços por trás do perfil genético e molecular em larga escala permitiram que centenas ou milhares de genes, seus transcritos e correspondentes proteínas, fossem analisados. Certamente, tais estudos integrativos das variações genéticas individuais, resultarão em avanços na precisão de diagnósticos, contribuindo ainda para a determinação de processos terapêuticos, bem como em uma maior compreensão dos mecanismos patogênicos responsáveis pelas manifestações clínicas em doenças complexas, como a ELA.⁽¹⁰⁾

A heterogeneidade genética implícita na ELA, que está ligada a um subconjunto de genes, os leva a fenótipos parecidos com os fenótipos encontrados em doenças neuromusculares (DNM).^(11,12) Pesquisadores de todo o mundo buscam identificar genes mendelianos que sofrem mutações e desenvolvem a doença. Somente em 2014, 22 genes foram envolvidos na patogênese da ELA, e mutações nesses genes representam cerca de dois terços dos casos de ELAF e aproximadamente 10% dos casos de ELAS.⁽¹³⁾

Devido à falta de testes para diagnóstico definitivo da ELA, a confirmação do diagnóstico é baseada em achados clínicos, resultados de

eletroneuromiografia e exclusão de outras patologias, o mesmo vale para genótipos, uma vez que não existem biomarcadores disponíveis para identifica-los. Para que o diagnóstico seja mais preciso, é necessário determinar os critérios que diferenciam a ELA de outros transtornos, e para facilitar esse diagnóstico e possíveis inferências sobre a patogenicidade da doença, a triagem genética está cada vez mais acessível e comum na prática clínica.⁽¹⁴⁾ Os principais estudos genéticos, até o momento, destacam as mutações nos genes *SOD1*, *TARDEBP*, *FUS* e *C9orf72* e seu envolvimento na ELA familiar e esporádica.

Em 1993, mutações no gene *SOD1* foram as primeiras a serem identificadas como causa da ELAF. Mutações dominantes nesse gene representam cerca de 20% das formas familiares da doença e aproximadamente 2% de todos os casos. O gene *SOD1* codifica uma metaloenzima que converte ânions superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, devastador para a defesa antioxidante celular. Embora o mecanismo por trás da expressão de *SOD1* mutante não seja completamente compreendida, animais transgênicos que expressam formas mutantes do gene desenvolvem uma doença neurodegenerativa progressiva que emula as características da ELA.⁽¹⁵⁾ Reduzindo a expressão da proteína *SOD1* mutante na medula espinhal, usando oligonucleotídeos antisense (ASOs)⁽¹⁶⁾ ou RNA de interferência (RNAi)⁽¹⁷⁾, foi-se possível retardar o início da doença e ter um efeito positivo na sobrevivência de animais testados. No entanto, os ASOs não conseguiram reduzir a proteína mutante em pacientes com ELA, e tanto ASOs como RNAi não tiveram sua eficácia terapêutica confirmada.⁽¹⁵⁾

O gene *TARDBP*, também conhecido como *TDP-43*, codifica a proteína TAR de ligação ao DNA de 43-kDa, trata-se de uma proteína ubiquitinada de inclusão sistólica patológica da ELAS e ELA-DEMÊNCIA frontotemporal (DFT). O *TDP-43*, é uma ribonucleoproteína heterogênea (hnRNP), predominantemente nuclear, que é lançada no citoplasma onde é clivada e hiperfosforilada nos axônios durante o estresse celular. Mais de 40 mutações foram identificadas no gene

TDP-43, e essas mutações representam 5% dos casos de ELAF. Mutações nesse gene também foram encontradas em outras doenças do SNC, incluindo traumatismo craniano, acidente vascular cerebral e doença de Parkinson.⁽¹⁸⁾

O gene *FUS*, também conhecido como TLS, compartilha características estruturais e funcionais com o gene *TDP-43*. A proteína FUS/TSL possui 75-kDa e, tal como TDP-43, é predominantemente nuclear e, em casos de ELA é encontrada erroneamente, dentro do citoplasma.⁽¹⁹⁾ A proteína FUS é multifuncional e essencial para vários processos celulares, incluindo estabilidade genômica, metabolismo de RNA e resposta ao estresse. Desde a associação do FUS com a ELA em 2009, houve um aumento considerável no número de pesquisas relativas à função normal do FUS, ainda não está claro se as mutações relacionadas à ELA provocam perda da função normal da proteína ou se induzem a proteína a um ganho de função tóxica no contexto dessa doença.⁽²⁰⁾ Em geral, as mutações de *FUS/TLS* representam cerca de 5% dos casos de ELAS. Embora a mutação FUS original tenha sido identificada como monozigótica recessiva, a maioria dos casos são predominantemente herdados.⁽¹⁹⁾

Em 2011, uma mutação no gene *C9orf72* foi descrita como a causa mais comum de ELA e DFT associado a ELA, a mutação ocorre inicialmente por uma expansão de repetição intrônica exonucleotídica (GGGGCC) no primeiro íntron do gene, localizado no cromossomo 9. Essa expansão mostra um percentual variável de penetrância, que está estritamente relacionada com a idade do paciente. Do ponto de vista molecular, o RNA mensageiro transcrito a partir da expansão do *C9orf72* reduz o pool de proteínas de ligação de RNA, desregulando consequentemente o metabolismo de RNA.⁽²¹⁾ Essa mutação está associada à cerca de 20-25% dos casos de DFT na ELAF nos Estados Unidos, e representa 5-10% de ELAS. Os autores descrevem ainda, existir uma tendência maior para a ELA bulbar em populações com C9-expandidas.⁽³⁾

Além dos genes anteriormente citados, sete novos genes foram identificados desde 2014, *MTR3*, *CHCHD10*, *TBK1*, *TUBA4A*, *C21orf2*, *CCNF* e *NEK1*. O gene *MATR3* apresentou até o momento quatro mutações (p.S85C, p.F115C, p.P154S e p.T622A) identificadas através do sequenciamento do exoma em quatro famílias de descendentes europeus com ELA ou em uma combinação de ELA e DFT. Os neurônios motores superiores e inferiores são afetados e a sobrevida varia entre 2 a 12 anos.⁽¹³⁾

O gene *CHCHD10* foi associado a ELA em uma grande família francesa após o sequenciamento do exoma que identificou uma mutação (p.S59L) no gene, que apresentava um fenótipo considerado complexo na ELA. Alterações como ataxia, parkinsonismo, miopatia mitocondrial e perda da audição foram observadas. A proteína *CHCHD10*, está localizada no espaço intermembranar mitocondrial e é importante para a manutenção da dinâmica mitocondrial e bioenergética celular.^(13,22)

As mutações no gene *TUBA4A* foram observadas em pacientes com ELAF após o sequenciamento do exoma, obtidos de pacientes europeus e americanos com a doença. É uma mutação considerada rara na ELA e apresenta maior frequência na variante *p.K430N*. A lesão nos neurônios motores primários ocorre quando a expressão da mutação missense no gene interfere na dimerização da tubulina, resultando em uma rede de microtúbulos enfraquecido com deficiência na interação com outras subunidades de tubulina e proteínas de transporte axonal dineína e cinesina. Até o momento existe pouca informação disponível sobre a apresentação do quadro clínico e o prognóstico dos pacientes com mutação no gene *TUBA4A*, porém, alguns pacientes apresentaram características clínicas típicas de DFT.^(13,23)

Os fenótipos clínicos associados às mutações no gene *TBK1* são heterogêneos, com uma média de idade não definida, progressão diferente e tempo de sobrevida irregular, a maioria das variantes patogênicas

identificadas no *TBK1* estão concentradas nos domínios de quinase, sugerindo que essas mutações podem operar alterando vias regulatórias a jusante. Até o momento foram identificadas algumas variantes que foram encontradas em cerca de 1% dos pacientes com ELAF e ELAS.^(13,24)

Outro gene associado a ELA foi o *CCNF*, identificado em uma grande família de descendentes europeus que apresentavam a doença. As características clínicas são de pacientes que apresentavam ELA típica, ELA com DFT ou DFT isolada com padrão autossômico dominante de herança e uma frequência de mutação global que variou entre 0,6 e 3,3% em populações brancas.⁽¹³⁾ O *CCNF* é responsável por marcar proteínas com ubiquitina para posterior degradação proteossomal. As células neuronais que expressam o *CCNF* mutante mostram um aumento na marcação de proteínas com ubiquitina, incluindo a proteína TDP43. Os pesquisadores sugerem que o aumento nas variantes afetam a degradação proteossômica por meio da marcação alterada de todas as proteínas com ubiquitina, ou, por não transferir proteínas marcadas com ubiquitina para o complexo de proteassoma para remoção.⁽²⁵⁾

Além dos genes citados, temos ainda achados sobre mutações heterozigóticas no gene *NEK1* encontradas em pacientes com ELAS. Os achados clínicos de pacientes com mutações em *NEK1* ainda não estão bem definidos, mas os pacientes parecem apresentar ELA típica, sem associação com demência. O mecanismo estrutural afetado é o tráfico lipídico endossomal e retículo endoplasmático, vias semelhantes foram descritas nos genes *ELA2* e *VAPB*. Um amplo estudo genômico evidenciou que a associação entre *NEK1* e *C21orf2* está relacionada à montagem de microtúbulos, na resposta e reparo de danos no DNA e na função mitocondrial. Segundo os autores que investigam tal associação, mais estudos clínicos e de replicação genética são necessários para melhor definir tal envolvimento com a ELA.^(13,25,26)

Células Tronco

Uma das terapêuticas existentes no tratamento da ELA são as células tronco (CT), que são células capazes de se diferenciar em tipos celulares especializados. Após serem transplantadas no paciente e migrarem para o tecido alvo, as CT podem executar funções específicas em qualquer sistema do corpo, atuando como um mecanismo de reparo interno,⁽²⁷⁾ até mesmo em tecidos neurais danificados.⁽²⁸⁾ A procura de um tratamento eficiente para ELA, estudiosos têm analisado a utilização dessas CT que poderão atuar, possivelmente, na indução da diferenciação em NMI, buscando substituir aqueles neurônios afetados pela doença, e NMS, no córtex cerebral; no resgate dos neurônios motores danificados, interligando-os à parte desnervada do músculo; e na indução à diferenciação de CT em células da glia (astrócitos ou oligodendrócitos), que produzem fatores de suporte para os neurônios motores.⁽²⁹⁾

No que se refere ao potencial de diferenciação, as CT podem ser: totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou unipotentes. As totipotentes podem gerar todos os tecidos embrionários e extra-embrionários; das pluripotentes podem derivar todos os tipos celulares do embrião; das multipotentes podem resultar diversas linhagens celulares e as unipotentes geram somente um tipo celular adulto.⁽³⁰⁾

As CT embrionárias são células pluripotentes provenientes da massa celular interna do blastocisto do embrião de mamíferos e podem diferenciar-se nas três camadas germinativas: ectoderme, mesoderme e endoderme, também podem ser originadas de tecidos adultos da medula óssea, chamada de células estaminais adultas.⁽³¹⁾ As CT somáticas são extraídas de células fetais, após gastrulação, ou de tecidos adultos, sendo encontradas em órgãos onde é essencial uma auto-renovação controlada. Esse tipo de CT é geralmente restrito a se diferenciar em somente alguns tipos celulares.⁽²⁹⁾

Há na literatura, uma vasta classificação de CT adultas com diferentes regiões de origem: células tronco mesenquimais (CTMs), que são

células somáticas multipotentes que podem ser encontradas na medula óssea, no tecido adiposo ou através do cordão umbilical,^(28,32,33) células mononucleares da medula óssea (BM-MNCs),^(34,35) células mesenquimais da medula óssea (BMSC), células mononucleares sanguíneas periféricas mobilizadas (M-PBMNCs) que são adquiridas através da administração do fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF) para aumentar o número dessas células na circulação, que são, em seguida, separadas e removidas através de uma técnica de separação de células (aférese),^(36,37) células tronco olfativas (OESC) extraídas de tecido do bulbo olfativo fetal humano⁽³⁷⁾ e células-tronco neurais.⁽²⁸⁾

Dentre os vários tipos de CT, a multipotencialidade das CTMs, seu fácil isolamento e cultura, assim como seu elevado potencial de expansão *ex vivo*, fazem dessas células um instrumento terapêutico capaz de desempenhar variadas aplicações clínicas, tanto no contexto de terapia celular, quanto genética. As CTMs apoiam o reparo e a regeneração, contribuindo para a homeostase tecidual e diferenciação para outros tipos de células. São definidas por três critérios mínimos: boa aderência, expressão de um conjunto definido de marcadores de superfície celular e pela capacidade de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos.⁽³⁸⁾ Além disso, influenciam as reações imunes pela produção de numerosas moléculas imunomoduladoras.⁽²⁸⁾

A descrição feita por alguns autores sobre os benefícios da terapia de transplante de CT, tanto em animais quanto em humanos não está bem definida, não está claro se tais benefícios ocorrem de forma isolada ou mediada por uma série de combinações de processos e mecanismos de ação ocasionadas pelas células transplantadas.⁽³⁹⁻⁴¹⁾ Matejckova et al., compararam CTMs derivadas da medula óssea de pacientes com ELA com um grupo controle saudável, composto de doadores submetidos a cirurgia ortopédica, os pesquisadores não encontraram nenhuma diferença significativa na atividade proliferativa celular de ambos os grupos, as células apresentavam capacidade de se diferenciar em adipócitos e osteoblastos em condições de indução, com uma maior expressão dos

marcadores de receptor de adipócitos ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR γ) e células progenitoras de adipócitos (ADPC) nas CTMs do grupo ELA.⁽³⁹⁾

Outra pesquisa já documentou a desaceleração da progressão da ELA em 10 pacientes que receberam CTMs, quando comparado com um grupo controle composto de 15 pacientes.⁽⁴²⁾ Um estudo realizado na Coreia, buscava principalmente identificar biomarcadores de resposta ao transplante, realizado em 37 pacientes com ELA que receberam transplantes de BMSC, os pacientes foram divididos em grupos ‘resposta’ e ‘não resposta’, com o primeiro grupo apresentando declínios significativos na escala de classificação funcional de ELA (escala ALSFRS).⁽⁴³⁾ Ainda, no estudo de Mazzine et al., observou-se que o transplante de CT em modelos animais de ELA pode retardar significativamente a progressão da doença e prolongar a sobrevivência.⁽³²⁾

Em uma revisão realizada com 19 ensaios clínicos de fase 1 e 2, nenhum deles randomizado, contendo 875 pacientes, foram analisados principalmente a segurança e a viabilidade dos procedimentos cirúrgicos envolvidos na implantação de células no cérebro e na medula espinhal de pacientes com ELA, nesse estudo foi analisado a via em que as células são implantadas, e se essa via pode estar associada à aceleração da progressão da doença. Não foram encontradas complicações cirúrgicas nos participantes e também não foi observado aceleração na progressão da doença relacionadas ao implante celular.⁽²⁸⁾

A limitada capacidade de reparo do cérebro humano adulto restringe o trabalho com CTMs. Apesar da persistência de ensaios clínicos com células estaminais neuronais somáticas e células progenitoras neuronais no cérebro humano adulto, existe pouca evidência quanto à contribuição dessas células para o reparo estrutural de neurônios em humanos.⁽³⁹⁾ As CTMs foram testadas devido seu efeito reparador, e atualmente, devido sua plasticidade e propriedades imunomoduladoras, é a principal escolha para terapia celular em DNM.⁽⁴⁰⁾

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ELA é uma patologia neurodegenerativa que atinge os neurônios motores inferiores e superiores, a maioria dos casos de ELA são classificados como esporádicos, e o restante apresenta padrão de herança autossômica dominante, sendo considerado de origem familiar. Devido à falta de testes para diagnóstico definitivo da ELA, a confirmação do diagnóstico é baseada simplesmente em exclusão, sintomas e resultados de eletromiografia, e o mesmo vale para genótipos, uma vez que ainda não existem biomarcadores confirmados para identificar essa patologia.

Para que o diagnóstico seja então mais preciso, é necessário determinar os critérios que diferenciam a ELA de outros transtornos. Nesse sentido, o estudo genômico vem se destacando, com o intuito de identificar biomarcadores que facilitem o diagnóstico da doença. Os principais estudos genéticos, até o momento, destacam as mutações nos genes *SOD1*, *TARDEBP*, *FUS*, *C9orf72* e *NEK1* e seu envolvimento na ELA familiar e esporádica.

Devido, ainda, a falta de tratamentos eficazes para ELA, os pesquisadores tem avaliado o uso e a aplicação de CT como terapia contra a doença. O transplante dessas células tem se mostrado eficaz em diversos modelos animais, mas o êxito da terapia com CT dependerá de estudos profundos sobre a biologia dessas células e da compreensão total da patogênese da ELA. Assim, novos estudos sobre a utilização de CT no tratamento da ELA e sobre a associação dessa doença com vários genes, são imprescindíveis, pois, certamente, tais estudos serão pilares para a melhoria tanto de processos terapêuticos, como na precisão do diagnóstico, bem como para maior compreensão dos mecanismos complexos que envolvem essa patologia.

REFERÊNCIAS

1. Mitsumoto H, Rabkin JG. Palliative care for patients with amyotrophic lateral sclerosis: “prepare for the worst and hope for the best”. *Jama*. 2007; 298 (2): 207-16.
2. Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, Mohamed H, Chaudhuri AR, Zalutsky R. How common are the “common” neurologic disorders? *Neurology*. 2007; 68(5): 326–37.
3. Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR et. al. A Hexanucleotide Repeat Expansion in C9ORF72 Is the Cause of Chromosome 9p21-Linked ALS-FTD. *Neuron*. 2011; 72(2): 257–68.
4. Oliveira A, Oda A. Reabilitação em Doenças Neuromusculares -Guia terapêutico prático. 1ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2014.
5. Robbercht W, Philips T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci*. 2013; 14(4): 248-64.
6. Worms PM. The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recente studies. *J Neurol Sci*. 2001; 191(1-2): 3-9.
7. Palermo S, Lima JB, Alvarenga RP. Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis-Europe/North America/South America/Asia. Discrepancies and similarities. Systematic review of the literature. *Rev Bras Neurol*. 2009; 45(2): 5-10.
8. Xerez RD. Rehabilitation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: literature review. *Acta Fisiatr*. 2008; 15(3): 182-8.
9. Wood-Allum C, Shaw PJ. Motor neurone disease: a practical update on diagnosis and management. *Clin Med. (Lond)*. 2010; 10(3): 252–8.
10. Wermuth PJ, Piera-Velazquez S, Rosenbloom J, Jimenez SA. Existing and novel biomarkers for precision medicine in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol*. 2018; 14(7): 421-32.

11. Nishiyama A, Niihori T, Warita H, Izumi R, Akiyama T, Kato M, et al. Comprehensive targeted next-generation sequencing in Japanese familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*. 2017; 53:194.e1-194.e8.
12. Nakamura R, Sone J, Atsuta N, Tohnai G, Watanabe H, Yokoi D, et al. Next-generation sequencing of 28 ALS-related genes in a Japanese ALS cohort. *Neurobiol Aging*. 2016; 39: 219-227.
13. Chia R, Chiò A, Traynor JB. Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis diagnostic and clinical implications. *Lancet Neurol*. 2018; 17(1): 94-102.
14. Al-Chalabi A, Hardiman O, Kiernan MC, Chiò A, Rix-Brooks B, Van den Berg LH. Amyotrophic lateral sclerosis moving towards a new classification system. *Lancet Neurol*. 2016; 15(11): 1182-94.
15. Gaj T, Ojala DS, Ekman FK, Byrne LC, Limsirichai P, Schaffer DV. In vivo genome editing improves motor function and extends survival in a mouse model of ALS. *Sci Adv*. 2017; 3(12):1-10.
16. Nizzardo M, Simone C, Rizzo F, Ulzi G, Ramirez A, Rizzuti M, et al. Morpholino-mediated SOD1 reduction ameliorates an amyotrophic lateral sclerosis disease phenotype. *Sci Rep*. 2016; 6: e 21301.
17. Thomsen GM, Gowing G, último J, Chen M, Vit JP, Staggenborg K, et al. Delayed disease onset and extended survival in the SOD1G93A rat model of amyotrophic lateral sclerosis after suppression of mutant SOD1 in the motor cortex. *J Neurosci*. 2014; 34 (37): 15587–600.
18. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2006; 314(5796): 130-3.
19. Kwiatkowski TJ, Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian T, Vandenburg CR, Russ C, et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16

cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2009; 323(5918): 1205-8.

20. Sama RR, Ward CL, Bosco DA. Functions of FUS/TLS From DNA Repair to Stress Response: Implications for ALS. *ASN Neuro*. 2014; 6(4): 1-18.

21. Calvo AC, Manzano R, Mendonça DM, Muñoz MJ, Zaragoza P, Osta R. Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Focus on Disease Progression. *Bio-med Res Int*. 2014: e925101.

22. Bannwarth S, Ait-El-Mkadem S, Chausseot A, Genin EC, Lacas-Gervais S, Fragaki K, et al. A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain*. 2014; 137(8): 2329-45.

23. Smith BN, Ticozzi N, Fallini C, Gkazi AS, Topp S, Kenna KP, et al. Exome-wide rare variant analysis identifies TUBA4A mutations associated with familial ALS. *Neuron*. 2014; 84(2): 324-31.

24. Oakes JA, Davies MC, Collins MO. TBK1: a new player in ALS linking autophagy and neuroinflammation. *Mol Brain*. 2017; 10(5): 1-10.

25. Williams KL, Topp S, Yang S, Smith B, Fifita JA, Warraich ST, et al. CCNF mutations in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Nat Commun*. 2016; 7:e11253.

26. Caroppo P, Camuzat A, Septenville A, Couratier P, Lacomblez L, Auriacombe S, et al. Semantic and nonfluent aphasic variants, secondarily associated with amyotrophic lateral sclerosis, are predominant frontotemporal lobar degeneration phenotypes in TBK1 carriers. *Alzheimers Dement*. 2015; 1(4): 481-6.

27. Mills KM, Szczerkowski JL, Habib SJ. Wnt ligand presentation and reception: from the stem cell niche to tissue engineering. *Open Biol*. 2017; 7(8): e170140.

28. Abdul-Wahid SF, Law ZK, Ismail NA, Azman-Ali R, Lai NM. Cell-based therapies for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016; 11:CD011742.

29. Lima SR, Gomes KB. Esclerose lateral amiotrófica e o tratamento com células-tronco. *Rev Bras Clin Med.* 2010; 8(6):531-7.
30. Pereira LC, Queiroz PR. Terapia celular em tratamento de doenças do sistema nervoso. *Universitas: Ciênc da Saúde.* 2013; 11(1): 29-41.
31. Pereira W. Estudo bioético sobre o desenvolvimento das pesquisas em células-tronco embrionárias no Brasil [Dissertação] [Brasília]: Universidade de Brasília, 2011. 91 f.
32. Mazzini L, Fagioli F, Boccaletti R, Mareschi K, Oliveri G, Olivieri C, et. al. Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis a methodological approach in humans. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2003; 4(3):158-61.
33. Mazzini L, Ferrero I, Luparello V, Rustichelli D, Gunetti D, Mareschi D, et. al. Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis A Phase I clinical trial. *Exp Neurol.* 2010; 223(1): 229-37.
34. Blaquer M, Moraleda JM, Iniesta F, Gómez-Espuch J, Meca-Lallana J, Villaverde R, et. al. Neurotrophic bone marrow cellular nests prevent spinal motoneuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis patients: a pilot safety study. *Stem Cells.* 2012; 30(6): 1277-85.
35. Prabhakar S, Marwaha N, Lal V, Sharma RR, Rajan R, Khandelwal N. Autologous bone marrow-derived stem cells in amyotrophic lateral sclerosis: a pilot study. *Neurol India.* 2012; 60(5):465-9.
36. Chiò A, Mora G, La Bella V, Caponnetto C, Mancardi G, Sabatelli M, et. al. Repeated courses of granulocyte colony stimulating factor in amyotrophic lateral sclerosis clinical and biological results from a prospective multicenter study. *Muscle Nerve.* 2011; 43(2):189-95.
37. Nefussy B, Artamonov I, Deutsch V, Naparstek E, Nagler A, Drory VE. Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor administration for treating amyotrophic lateral sclerosis: a pilot study. *Amyotrophic Lateral Sclerosis. Amyotroph Lateral Scler.* 2010; 11(1-2): 187-93.

38. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et. al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-7.
39. Matejckova N, Zajicova A, Hermankova B, Kossl J, Bohacova P, Holan V, et. al. Characterisation of mesenchymal stem cells from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Pathol*. 2018; 71(8): 735-42.
40. Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008; 40(5):815-20.
41. Cho GW, Noh MY, Kim HY, Koh SH, Kim KS, Kim SH. Bone marrow-derived stromal cells from amyotrophic lateral sclerosis patients have diminished stem cell capacity. *Stem Cells Dev*. 2010; 19(7): 1035-42.
42. Rushkevich YN, Kosmacheva SM, Zabrodets GV, Ignatenko SI, Goncharova NV, Severin IN, et al. The Use of Autologous Mesenchymal Stem Cells for Cell Therapy of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis in Belarus. *Bull Exp Biol Med*. 2015; 159(4): 576-81.
43. Tang BL. The use of mesenchymal stem cells (MSCs) for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) therapy - a perspective on cell biological mechanisms. *Rev Neurosci*. 2017; 28(7): 725-38.

POLIMORFISMOS GENÉTICOS E O METABOLISMO DO FOLATO NA SUSCEPTIBILIDADE ÀS LEUCEMIAS

Kamilla de Faria Santos^[a] (ver nota); Jéssica Barletto de Sousa Barros^[b] (ver nota);
Rayana Pereira Dantas de Oliveira^[c] (ver nota); Rodrigo da Silva Santos^[d] (ver nota);
Angela Adamski da Silva Reis^[e] (ver nota)

RESUMO

A leucemia é uma neoplasia que afeta o processo normal de desenvolvimento e diferenciação das células sanguíneas, havendo acúmulo de blastos na medula óssea. Tanto da perspectiva clínica quanto patológica, a leucemia é dividida em grandes grupos. A primeira classificação é com relação ao tempo de desenvolvimento, podendo ser aguda ou crônica, e a segunda grande classificação das leucemias é referente ao tipo celular afetado pelas perturbações, podendo apresentar a forma linfóide ou mielóide. A etiologia das leucemias ainda não é bem definida, mas sabe-se que há uma susceptibilidade familiar, assim como uma contribuição do ciclo do metabolismo do folato no curso da doença. O folato é um micronutriente encarregado de doar grupos metil para as reações de síntese, metilação e reparo do DNA. Os níveis de folato podem ser alterados devido à presença de polimorfismos em genes que codificam enzimas associadas ao seu metabolismo, e assim desencadear o processo de carcinogênese. O enfoque desta revisão é relacionar os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em enzimas que atuam no controle do nível de folato intracelularmente, a saber: enzima carreadora de folato reduzido 1 (RFC1) e enzima metionina sintase (MTR), com a leucemogênese.

Palavras-chave: Leucemias. Metabolismo do folato. Polimorfismos de nucleotídeo único.

DETERMINANTES GENÉTICOS QUE INFLUENCIAM NA SUSCEPTIBILIDADE À HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

Rayana Pereira Dantas de Oliveira^[a] (ver nota); Kamilla de Faria Santos^[b] (ver nota);
Jéssica Barletto de Sousa Barros^[c] (ver nota); Rodrigo da Silva Santos^[d] (ver nota);
Angela Adamski da Silva Reis^[e] (ver nota)

RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma doença crônica não transmissível, caracterizada pela elevação sustentada dos níveis pressóricos. Afeta 25% da população mundial e 36 milhões de indivíduos no Brasil, com maior prevalência em idosos. Sua causa pode ser primária ou secundária, tendo vários fatores de risco associados, como idade, sexo, tabagismo, alcoolismo, sedentarismo, obesidade e diabetes *mellitus*. O estresse oxidativo é considerado patognomônico da HAS, situação em que há redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), um vasodilatador importante na manutenção do tônus vascular. O polimorfismo dos genes *GSTT1* e *GSTM1* prejudica a atividade das enzimas Glutathione S-transferase (GST), atuantes na fase II de desintoxicação celular, contribuindo para o aumento do estresse oxidativo. O gene *ECA*, responsável pela codificação da Enzima conversora de Angiotensina (ECA), apresenta um polimorfismo de inserção e deleção (I/D), o qual pode interferir diretamente nos níveis de ECA circulante e, conseqüentemente, na atuação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Por ser uma doença de caráter multifatorial complexa, incluindo fatores genéticos, o estudo de polimorfismos que predisõem ao desenvolvimento da doença faz-se necessário.

Palavras-chave: Hipertensão arterial sistêmica (HAS); polimorfismos genéticos; estresse oxidativo; sistema renina-angiotensina-aldosterona.

ASSOCIAÇÃO DA VIA MAPK E DOS GENES ACE E NRF2 NA NEFROPATIA DIABÉTICA

Jéssica Barletto de Sousa Barros^[a] (ver nota), Kamilla de Faria Santos^[b] (ver nota), Rayana Pereira Dantas de Oliveira^[c] (ver nota), Rodrigo da Silva Santos^[d] (ver nota), Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer^[e] (ver nota), Angela Adamski da Silva Reis^[f] (ver nota)

RESUMO

O diabetes *mellitus* (DM) é caracterizado pelo aumento crônico dos níveis plasmáticos de glicose, e pode ser classificado em diabetes *mellitus* do tipo 1 e do tipo 2, bem como em outros tipos específicos. Em virtude dos níveis hiperglicêmicos constantes presentes no DM, diversas complicações em tecidos e órgãos podem ocorrer, como neuropatia, retinopatia e nefropatia diabética. A nefropatia diabética (ND), também conhecida como doença renal do diabetes, ocorre em aproximadamente 40% dos indivíduos com diabetes *mellitus*, e tem sido considerada a principal causa de insuficiência renal terminal. Dentre os principais fatores fisiopatológicos que estão envolvidos no desenvolvimento e na evolução da ND em portadores de DM, encontra-se o sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), fatores genéticos, entre os quais se destacam os genes *ACE* e *NRF2*, e vias biológicas, como a via MAPK. O SRAA, bem como o gene *ACE*, está relacionado ao controle da pressão arterial sistêmica, o gene *NRF2* está associado a atividade anti-oxidante, e a via MAPK a atividade inflamatória. Desta forma, a elucidação desses fatores na nefropatia diabética pode ser útil no diagnóstico, entendimento da patogênese, bem como no delineamento terapêutico da doença.

Palavras-chave: Diabetes *Mellitus*. Nefropatia Diabética. Via MAPK. Gene *ACE*. Gene *NRF2*.

GENES E MicroRNAs ASSOCIADOS COM A INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C

Jéssica Barletto de Sousa Barros^[a] (ver nota), Kamilla de Faria Santos^[b] (ver nota), Rayana Pereira Dantas de Oliveira^[c] (ver nota), Laura Raniere Borges dos Anjos^[d] (ver nota), Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer^[e] (ver nota), Rodrigo da Silva Santos^[f] (ver nota), Angela Adamski da Silva Reis^[g] (ver nota)

RESUMO

O vírus da hepatite C (HCV) pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Hepacivirus*. Esse é considerado um pequeno vírus, possui estrutura envelopada e um RNA de fita simples como ácido nucléico. Além disso, é responsável por ocasionar a hepatite C, uma doença que possui uma evolução lenta, e que contempla diferentes fases de infecção, aguda (que pode evoluir para uma cura espontânea) e crônica, que desencadeia a destruição da estrutura do fígado, podendo em alguns casos evoluir para cirrose hepática e carcinoma hepatocelular. No contexto genético, alguns genes e microRNAs já foram relacionados à infecção pelo vírus da hepatite C, tais como o *IL28-B* e miR-122, respectivamente. O gene *IL-28B* possui dois importantes polimorfismos, rs12979860 e rs8099917, ambos associados a cura espontânea da infecção pelo HCV, bem como a uma resposta virológica sustentada ao tratamento. Por outro lado, o miR-122 se destaca por sua importante participação na replicação do HCV, atuando na estabilização do RNA viral, bem como o protegendo da resposta imune do hospedeiro. Assim, é possível observar que todo o contexto da infecção envolve a interação patógeno-hospedeiro, e a compreensão desses aspectos pode ser útil na elucidação da doença. Desta forma, o objetivo dessa revisão foi verificar a associação do gene *IL-28B* e do miR-122 no contexto da infecção pelo HCV.

Palavras-chave: HCV. Gene *IL-28B*. MiR-122.

- 5º lugar no VI Prêmio SBPC/GO de Popularização da Ciência 2019 da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência – Regional Goiás.



- E-book Prevenção e Promoção de saúde, vol. 1 – Atena Editora, 2019. ISBN: 978-85-7247-827-4. DOI: 10.22533/at.ed.27419091217.

CAPÍTULO 17

METODOLOGIAS ATIVAS DE APRENDIZAGEM E O ENSINO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Kamilla de Faria Santos

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PGBM), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia – GO, Brasil.

Caroline Christine Pincela da Costa

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PGBM), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia – GO, Brasil.

Carlos Antônio Pereira Júnior

Colegiado de Ciências da Natureza (LEdoC), Unidade Acadêmica Especial de Ciências Humanas, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiás – GO, Brasil.

Benedito Rodrigues da Silva Neto

Departamento de Microbiologia, Parasitologia, Imunologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia – GO, Brasil.

Angela Adamski da Silva Reis

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas (ICB II), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia – GO, Brasil.

Rodrigo da Silva Santos

Colegiado de Ciências da Natureza (LEdoC), Unidade Acadêmica Especial de Ciências Humanas, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiás – GO, Brasil. Autor para contato: rdsantosgo@gmail.com

aprendizagem significativa, o Ensino de Ciências Biológicas deve compreender a necessidade de aplicar novas metodologias que buscam o envolvimento ativo do aluno, oferecendo a eles a oportunidade de abandonar a prática de recebimento passivo de conhecimentos, inserindo-se, nesse cenário, as chamadas Metodologias Ativas de Aprendizagem (MAA). Essas metodologias buscam exatamente a independência do aluno em relação ao seu processo de formação. Assim, esse capítulo busca, por meio de pesquisa bibliográfica, elucidar ou identificar o que são, e quais são as principais MAA aplicadas ao Ensino de Ciências Biológicas, principalmente nos ensinos de Bioquímica e Biologia Molecular e, como tem se dado a relação entre educação científica e a concepção de um aluno ativo no processo de aprendizagem. No ensino de Ciências Biológicas, nota-se a utilização de MAA como a Aprendizagem Baseada em Problemas, a Problematização e o Método do Arco de Maguerez, Instrução por pares, entre outros. Enquanto, no ensino de Bioquímica e Biologia Molecular, especificamente, temos a utilização de MAA como o ensino por investigação, abordagem CTSA (Ciência, Tecnologia, Sociedade e Ambiente), elaboração de mapas conceituais e metabólicos,

RESUMO: Em busca de uma proposta de

- E-book Prevenção e Promoção de saúde, vol. 5 – Atena Editora, 2019. ISBN: 978-85-7247-837-3. DOI: 10.22533/at.ed.37319181223.

CAPÍTULO 23

MAPAS CONCEITUAIS: ESTRATÉGIAS PEDAGÓGICAS DE ENSINO E APRENDIZAGEM EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Caroline Christine Pincela da Costa

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PGBM), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia – GO, Brasil.

Kamilla de Faria Santos

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PGBM), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia – GO, Brasil.

Kelly Rita Ferreira dos Santos Silveira

Programa Institucional de Bolsas de Licenciatura (PROLICEN-CNPq), Licenciatura em Educação do Campo (Ciências da Natureza), Unidade Acadêmica Especial de Ciências Humanas, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiás – GO, Brasil.

Carlos Antônio Pereira Júnior

Colegiado de Ciências da Natureza (LEdoC), Unidade Acadêmica Especial de Ciências Humanas, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiás – GO, Brasil.

Benedito Rodrigues da Silva Neto

Departamento de Microbiologia, Parasitologia, Imunologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia – GO, Brasil.

Angela Adamski da Silva Reis

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas (ICB II), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia – GO, Brasil.

Rodrigo da Silva Santos

Colegiado de Ciências da Natureza (LEdoC), Unidade Acadêmica Especial

de Ciências Humanas, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiás – GO, Brasil. Autor para contato: rdesantoego@gmail.com

RESUMO: Os conteúdos de genética e biologia molecular são recorrentemente descritos como de difícil compreensão pelos estudantes, por serem repletos de termos técnicos e científicos. Tal dificuldade, na maioria das vezes, afasta o interesse dos alunos dos conteúdos e também da aprendizagem. Nesse cenário, o uso de metodologias ativas de ensino-aprendizagem possibilitam a participação ativa dos educandos, tornando-os responsáveis por sua formação, enquanto o docente assume papel de facilitador e mediador do processo de aprendizagem. Os mapas conceituais atuam como ferramentas pedagógicas inseridas no contexto das metodologias ativas, propiciando aos alunos o que foi denominado por David Ausubel como aprendizagem significativa. Propostos por Joseph Novak, à luz da teoria de Ausubel, os mapas conceituais são utilizados com o intuito de facilitar o entendimento de conceitos complexos. Dessa forma, sua organização depende da captação dos conceitos fundamentais e do conteúdo num contexto geral, e o docente pode avaliar o desenvolvimento da aprendizagem de