

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Histologia e Embriologia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas

Tese de Doutorado

**Análise de Medula Espinhal, Líquido Cefalorraquidiano e Soro de Portadores de
Esclerose Lateral Amiotrófica**

Por: Deise Maria Furtado de Mendonça

Orientadoras: Prof^ª Dr^ª Ana Maria Blanco Martinez

Prof^ª Dr^ª Leila Maria Cardão Chimelli

Rio de Janeiro

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Deise Maria Furtado de Mendonça

Análise de Medula Espinhal, Líquido cefalorraquidiano e Soro de Portadores de
Esclerose Lateral Amiotrófica

Tese de doutorado apresentada ao Programa de
Ciências Morfológicas da Universidade Federal do
Rio de Janeiro como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Doutora em Ciências
Morfológicas.

Orientadoras: Ana Maria Blanco Martinez
Leila Chimelli

Rio de Janeiro

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Mendonça, Deise Maria Furtado de
Análise de Medula Espinhal, Líquido cefalorraquidiano e
Soro de Portadores
de Esclerose Lateral Amiotrófica / Deise Maria Furtado de
Mendonça. Rio de Janeiro, 2006.
158 f.

Dissertação (Doutorado em Ciências Morfológicas) –
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
Biomédico, 2006.

Orientadoras: Ana Maria Blanco Martinez
Leila Chimelli

1. Esclerose Lateral Amiotrófica. 2. Imunohistoquímica.
3. Eletroforese de Proteínas. 4. Análise Proteômica. 5.
Fluorescência de Raios X por Reflexão Total – Teses.
I. Martinez, Ana Maria Blanco e Chimelli, Leila (Orient.). II.
Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto
Biomédico. III. Análise de Medula Espinhal, Líquido
cefalorraquidiano e Soro de
Portadores de Esclerose Lateral Amiotrófica.

Deise Maria Furtado de Mendonça

Título: Análise de Medula Espinhal, Líquido cefalorraquidiano e Soro de Portadores de Esclerose Lateral Amiotrófica

Tese de doutorado submetida ao Programa de Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro para obtenção do título de Doutora em Ciências Morfológicas sob a orientação das professoras Ana Maria Blanco Martinez e Leila Chimelli.

Aprovado em ____ de _____ de 2006 pela banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Blanco Martinez – PCM/UFRJ (Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Leila Chimelli – PCM/UFRJ (Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Silvana Allodi – PCM/UFRJ (Revisora e Suplente)

Prof^a. Dr^a. Daniela Uziel – PCM/UFRJ

Prof. Dr. Rafael Linden – IBCCF/UFRJ

Prof^a. Lea Grinberg – USP

Prof^a. Dr^a. Marzia Puccioni-Sohler – HUCFF/UFRJ

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof^ª Ana Martinez pela imensa dedicação, sabedoria e carinho com que realizou o trabalho de me orientar nessa grande e importantíssima etapa de minha vida.

Agradeço a Prof^ª Leila Chimelli pela sua colaboração nos momentos necessários.

Agradeço ao Prof. Vivaldo pela sua imensa preocupação, generosidade e dedicação para a realização deste trabalho.

Agradeço a Prof^ª Silvana pela eficiente e meticulosa revisão desta tese.

Agradeço à amiga Sheila Martins, aluna de doutorado do Laboratório de Morfogênese Celular, pela sua enorme contribuição e devoção para a realização de importante parte deste trabalho, além de seu carinho e apoio nos momentos difíceis.

Agradeço à Marli Pernes, médica, chefe do ambulatório de Doenças do Neurônio Motor do INDC, por sua contribuição nos momentos iniciais do desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao amigo Rafael Higashi, médico residente do INDC, pela sua dedicação “full time” para obtenção das amostras de líquido cefalorraquidiano e sangue de pacientes portadores de ELA.

Agradeço ao Prof. Marcelo Muscará pela sua colaboração.

Agradeço à Renata Serpa pela sua colaboração, carinho e boa vontade em sempre me ajudar.

Agradeço à amiga Lillian pela sua colaboração, pela sua disposição infinita, pelo seu bom humor e pela facilidade de transformar as coisas difíceis nas mais simples possíveis.

Agradeço à Luciana Pizzati pela sua colaboração para a realização da análise proteômica.

Agradeço à minha amiga e irmã Simone Florim. Não existem palavras que expressem a verdade a seu respeito. Talvez caráter, humanidade e amizade fossem boas para que eu pudesse usar.

Agradeço às amigas Inês pelo seu ombro amigo, por sua sensibilidade e impressionante preocupação com o meu bem-estar e Fátima por sua generosidade, tranquilidade e saber com relação às coisas da vida que muito me acalmou ao longo destes anos.

Agradeço à Solange Canavarro por ter me mostrado as portas para um novo mundo. Apesar de meu enorme esforço ao longo destes anos, sem o seu incentivo nada disso seria realidade.

Agradeço à Tânia por seu desempenho em realizar muito mais atividades do que deveria e sempre com uma enorme tranquilidade e atenção.

Agradeço aos amigos cujo convívio me proporcionou enorme alegria e prazer: Suelen, Clynton, Michel, Renata, Marcelo Narciso, Nádia, Gisele, Tércia, Luciana, Rose, Jane, Suzana e Bruno.

Agradeço à minha família e meus amigos por todo o apoio e compreensão.

RESUMO

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) afeta os neurônios do sistema motor somático. Algumas das características histopatológicas da doença são a presença de agregados de proteínas como neurofilamentos e ubiquitina, e astrocitose. Sugere-se que estes agregados protéicos podem contribuir diretamente para a degeneração dos neurônios motores ou serem consequência de um processo primário. Os neurofilamentos são elementos estruturais essenciais no citoesqueleto neuronal. São compostos de três subunidades: NF-L, NF-M e NF-H. A ubiquitina, associada a um complexo catalítico, o proteasoma 26S, participa na degradação de proteínas de vida curta, desnaturadas ou erroneamente montadas. Os astrócitos participam da manutenção de condições adequadas ao microambiente neuronal e parece que estas células podem participar ativamente na patogenia da doença. O estresse oxidativo parece estar também intimamente relacionado à doença, através de uma cascata de eventos que levaria à formação de produtos neurotóxicos capazes de promover a neurodegeneração. Alterações nas concentrações protéicas ou aumento na expressão de fatores relacionados ao estresse oxidativo na medula espinhal, no líquido cefalorraquidiano, ou no soro dos portadores de ELA podem refletir os processos patológicos da doença. Em nosso trabalho tivemos como objetivo avaliar a presença da ubiquitina e do proteasoma 26S em medula espinhal de portadores de ELA e avaliar a expressão de proteínas, elementos-traço e fatores relacionados ao estresse oxidativo, no líquido cefalorraquidiano e no sangue de portadores da doença. Em nossos resultados observamos perda de neurônios motores nos casos de ELA e os neurônios remanescentes apresentaram-se atróficos ou com alterações intracitoplasmáticas. Também observamos extensa astrocitose. Nos casos de ELA a imunorreação para ubiquitina e proteasoma foi forte nos neurônios do corno anterior da medula e em alguns astrócitos. Observamos a presença da subunidade pesada dos neurofilamentos no líquido cefalorraquidiano de 7 das 10 amostras de portadores de ELA analisadas, enquanto que a análise para as subunidades média, leve e para o proteasoma foi negativa. Examinamos a presença de resíduos de nitrotirosina nas proteínas presentes no líquido cefalorraquidiano e no soro dos pacientes com os casos-controle, com a intenção de investigar fatores relacionados ao estresse oxidativo, porém não houve diferenças. Pela análise proteômica observamos diferenças na expressão protéica entre os grupos e as proteínas foram separadas e estão sendo analisadas por espectrometria de massa. Analisamos a presença de diferentes elementos-traço no líquido cefalorraquidiano e no soro dos portadores de ELA e evidenciamos aumento significativo das concentrações de cálcio, cloro e potássio quando comparado aos casos-controle. Concluimos que a via ubiquitina-proteasoma está, de alguma forma, envolvida com a neurodegeneração em casos de ELA. Esta via pode participar do processo patogênico de forma direta ou sua desorganização pode ser uma consequência da tentativa de restauração do funcionamento celular. Futuramente, talvez seja possível utilizar a subunidade pesada dos neurofilamentos como biomarcador presente no líquido cefalorraquidiano de portadores da doença. As amostras estudadas não apresentaram resíduos de nitrotirosina, mas outras análises podem ser realizadas. Evidenciamos diferença de expressão protéica no líquido cefalorraquidiano de portadores de ELA quando comparado aos casos-controle. Além disso houve aumento de concentração de cálcio, cloro e potássio no líquido cefalorraquidiano dos portadores da doença.

ABSTRACT

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease that affects the somatic motor system. Some histopathological features of the disease are the presence of intraneuronal protein aggregates, like neurofilament and ubiquitin, and astrogliosis. The presence of protein aggregates suggests that these proteins may contribute to the degeneration of motoneurons or are a consequence of some other primary process. Neurofilaments are the major structural elements of the neuronal cytoskeleton. They play an important role in cell architecture and differentiation, as well as determination and maintenance of fibre calibre. They are composed of three different polypeptides: NF-L, NF-M and NF-H. Ubiquitin associated with a catalytic complex, the proteasome, plays an essential role in the degradation of most cell proteins, such as abnormal and short-lived proteins. Astrocytes have a strong interaction with neurons and are important in the maintenance of the neuronal microenvironment, and the participation of astrocytes in the molecular mechanism of ALS and other neurodegenerative diseases is a new emerging concept. Oxidative stress also seems to be related to the disease, through the production of neurotoxic compounds that could lead neurons to degeneration. Changes in protein concentrations or increase of elements related to oxidative stress in spinal cord, cerebrospinal fluid (CSF) or serum of ALS patients can reflect the pathological process of the disease. In the present study we evaluated the presence of ubiquitin and proteasome 26S in the spinal cord of ALS patients and control patients and evaluated the expression of proteins, trace elements and the presence of elements related to oxidative stress in CSF and serum of ALS patients. In our results we observed loss of motoneurons in ALS cases and some remaining neurons exhibited different abnormalities. We also observed extensive astrogliosis and intracitoplasmatic inclusions. In ALS cases, ubiquitin and proteasome immunostaining were strong in the motoneurons of anterior horn spinal cord and in some astrocytes. We observed positive reaction for neurofilament heavy subunit in ALS CSF in 7 of 10 samples studied, whereas light, medium neurofilaments subunits and proteasome were negative. We investigated the presence of protein nitration in CSF and serum of ALS patients, with the objective of evaluating oxidative stress but we did not observe differences between the groups. Through proteomic analysis of CSF samples we observed differences in protein expression of both groups. The proteins we observed were separated and are being analyzed by mass spectrometry. We analyzed the presence of trace elements in CSF and serum of ALS and of control cases and observed significant increase in calcium, chlorine and potassium concentrations when compared to control cases. We concluded that the ubiquitin-proteasome pathway may be involved in the pathogenesis of the disease. In the future, perhaps it will be possible to use neurofilament heavy subunit as a biomarker for diagnosis of ALS. Different proteins are expressed in ALS CSF and the identification of these proteins may also be very useful in the diagnosis of the disease. Moreover, alterations in the concentrations of calcium, chlorine and potassium were observed in by CSF of ALS cases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema dos possíveis fatores etiopatogênicos da ELA	22
Figura 2. Esquema representativo das alterações celulares provocadas pela enzima SOD1 mutante.....	25
Figura 3. Esquema representativo das alterações celulares provocadas pela enzima SOD1 mutante.....	27
Figura 4. Esquema representativo das alterações mitocondriais provocadas pela enzima SOD1 mutante.....	33
Figura 5. O transporte axonal ocorre de forma anormal na ELA.....	35
Figura 6. Composição dos neurofilamentos axonais nos estados imaturo (esquerda) e maduro (direita).....	37
Figura 7. Desenho esquemático exibindo a regulação da fosforilação de proteínas do citoesqueleto em axônios mielinizados sob condições normais.....	39
Figura 8. Desenho esquemático representando as vias de sinalização para a fosforilação de proteínas do citoesqueleto sob condições fisiológicas.....	40
Figura 9. Desenho esquemático representando a regulação da fosforilação de proteínas do citoesqueleto sob condições fisiológicas.....	41
Figura 10. Desenho esquemático da via ubiquitina-proteasoma.....	45
Figura 11. Um modelo em 3D de um único complexo completo do proteasoma 26S, derivado por processamento de imagem por computador.....	47
Figura 12. Desenho esquemático do destino das proteínas celulares sujeitas a fatores de estresse.....	48
Figura 13. Fotomicrografias de medula espinhal coradas com Hematoxilina-Eosina e Luxol Fast Blue	81
Figura 14. Imunohistoquímica para GFAP	84
Figura 15. Imunohistoquímica para Ubiquitina	86
Figura 16. Imunohistoquímica para Proteasoma	89
Figura 17. Análise quantitativa da expressão de Proteasoma 20S	91
Figura 18. SDS-PAGE.....	93
Figura 19. Western Blotting para Neurofilamento Pesado	95
Figura 20. Western Blotting para Proteasoma	97

Figura 21. Western Blotting para resíduos de Nitrotirosina	99
Figura 22. Análise Proteômica das Amostras de Líquido Cefalorraquidiano de Pacientes Portadores de ELA e de Casos Controle	101
Figura 23. Análise de Elementos-Traço no Líquido Cefalorraquidiano de Portadores de ELA por Fluorescência de Raios X por Reflexão Total	113
Figura 24. Análise de Elementos-Traço no Líquido Cefalorraquidiano de Portadores de ELA por Fluorescência de Raios X por Reflexão Total	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critério diagnóstico para ELA baseado no consenso internacional de 1990.....	20
Tabela 2 - Casos de ELA (material de autópsia) utilizados.....	55
Tabela 3 - Casos de ELA (LCR) utilizados.....	61
Tabela 4 - Alterações morfológicas encontradas nos casos de ELA.....	71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CA – Corno Anterior

ELA – Esclerose Lateral Amiotrófica

HE – Hematoxilina-Eosina

M – Molar

ME – Medula Espinhal

MO – Microscópio Óptico

Mm – Milímetros

NGS – Soro Normal de Cabra

NF-H – Neurofilamento Pesado

NF-M – Neurofilamento Médio

NF-L – Neurofilamento Leve

Nm – Nanômetro

SNC – Sistema Nervoso Central

SB – Substância Branca

SC- Substância Cinzenta

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
AGRADECIMENTOS	7
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	8
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	11
APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA	15
I – INTRODUÇÃO	17
I.1 Esclerose Lateral Amiotrófica	17
I.1.1 - Etiopatogenia	22
I.1.1.1 – Características neuropatológicas principais	23
I.1.1.2 – Aspectos Genéticos	23
I.1.1.3 – Animais transgênicos na ELA	28
I.1.1.4 – Envolvimento não-neural	29
I.1.1.5 – Neuroquímica	30
Excitotoxicidade	30
Estresse Oxidativo	31
Disfunção Mitocondrial	32
Desorganização do Citoesqueleto	34
Via Ubiquitina-Proteasoma	42
Morte Celular	49
I.1.2 – Farmacoterapia	50
II.– OBJETIVOS	52
II.1– Objetivos Gerais	52
II.2– Objetivos Específicos	52
III. – MATERIAIS E MÉTODOS	54
III.1. – Material	54
III.2 – Processamento do material de autópsia	54
III.2.1 - Técnicas de coloração	56
III.2.2 – Imunohistoquímica	56

III.2.3 – Análise Estatística dos Corpos Celulares Positivos Para Proteasoma	58
III.3 – Colheita das amostras de Líquido Cefalorraquidiano	58
III.3.1 – Pacientes de ELA e Grupo Controle	60
III.3.2 – Processamento do Líquido Cefalorraquidiano para SDS-PAGE	61
III.3.3 – Western-Blotting para Neurofilamentos e Proteasoma	62
III.3.4 – Western-Blotting para Proteínas Contendo Resíduos de Nitrotirosina	63
III.3.5 – Processamento do Líquido Cefalorraquidiano para Análise Proteômica	65
Purificação de Proteínas	65
Eletroforese Bidimensional	66
Isoeletrofocalização (1D)	66
Segunda Dimensão (2D)	66
Análise dos Padrões Proteômicos	67
III.3.6 – Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF)	68
Preparação das Amostras de Soro	68
Preparação das Amostras de Líquido Cefalorraquidiano	68
Instrumentação	69
Análise Estatística	69
IV. – RESULTADOS	70
IV.1. - Observações Gerais	70
IV.2. - Imunohistoquímica para GFAP	72
IV.3. - Imunohistoquímica para Ubiquitina	72
IV.4. - Imunohistoquímica para Proteasoma (subunidades α e β)	73
IV.5. – Análise Quantitativa	74
IV.6. – SDS-PAGE	74
IV.7. – Western Blotting para Neurofilamentos e Proteasoma 20S	75
IV.8. – Western Blotting para Proteínas com Resíduos de Nitrotirosina	76
IV.9. – Análise Proteômica	77
Purificação das amostras	77
Eletroforese Bidimensional	78
Análise dos Padrões Proteômicos	78
IV. 10. – Fluorescência de Raios X por Reflexão Total	79

V.- DISCUSSÃO	119
V.1 – Características Gerais	119
V.2 – Via Ubiquitina-Proteasoma e Neurônios Motores de Portadores de ELA	120
V.3 – Via Ubiquitina-Proteasoma e Astrócitos em Portadores de ELA	123
V.4 – Neurofilamentos e Líquido Cefalorraquidiano de Portadores de ELA	124
V.5 – Proteasoma e Líquido Cefalorraquidiano de Portadores de ELA	128
V.6 – Resíduos de Nitrotirosina em Líquido Cefalorraquidiano e Soro de Portadores de ELA	129
V.7 – Análise Proteômica de Líquido Cefalorraquidiano de Portadores de ELA	131
V.8 – Fluorescência de Raios X por Reflexão Total e Líquido Cefalorraquidiano de Portadores de ELA	134
VI. – CONCLUSÕES	137
VII.– REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
VIII. – ANEXOS	153
Carta de aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética do Instituto de Neurologia Deolindo Couto	154
Carta de consentimento livre e esclarecido	155
Trabalhos publicados	156

APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA

Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença do sistema nervoso que afeta os neurônios responsáveis pelo controle da musculatura voluntária, sendo, portanto, uma doença do sistema motor caracterizada pela degeneração progressiva das células do corno anterior da medula espinhal, podendo variavelmente afetar os neurônios dos núcleos motores presentes no tronco encefálico e os neurônios do córtex motor. A ELA foi descrita em 1874 por Charcot e, apesar de ser foco de muita investigação ao longo dos anos, sua etiologia ainda não é definida e o diagnóstico é baseado nos sinais e sintomas apresentados pelo paciente, não existindo exames laboratoriais que possam auxiliar os profissionais de saúde.

Existem vários fatores relacionados à patogênese da ELA, mas nenhum deles, isoladamente, pode ser considerado um fator desencadeante. Acredita-se que a integração entre vários fatores relacionados à doença possa conduzir à degeneração dos neurônios motores. Estes fatores podem ser, por exemplo, ambientais, genéticos e fatores relacionados à idade e a distúrbios metabólicos das células do sistema nervoso. A doença, portanto, é considerada como um processo degenerativo de origem multifatorial, onde diferentes mecanismos moleculares podem contribuir para a injúria dos neurônios motores (Julien, 2001).

Uma das características histopatológicas da doença é a presença de agregados de proteínas como neurofilamentos (Hirano, 1996; Lee e Cleveland, 1996; Bajaj et al., 1999; Julien, 1999; Seilhean et al., 2004; Mendonça et al., 2005), ubiquitina (Leigh et al., 1991; Migheli et al., 1994; Ellison et al., 1998; Seilhean et al., 2004), tau e β -amilóide (Sasaki e Iwata, 1999; Yang et al., 2003; Calingasan et al., 2005). A presença desses agregados protéicos sugere que estes elementos podem contribuir diretamente para a degeneração dos neurônios motores ou serem consequência de um outro processo primário.

A degradação de proteínas de vida curta, desnaturadas ou erroneamente montadas, bem como proteínas contendo aminoácidos oxidados ou qualquer tipo de aminoácidos anormais é realizada no complexo enzimático denominado proteasoma após serem ligadas à ubiquitina (Alvez-Rodrigues et al., 1998; Chung et al., 2001). Portanto, a via ubiquitina-proteasoma exerce um papel ativo na degradação de proteínas citosólicas (Hirano, 1991) e sua disfunção pode estar associada ao acúmulo de proteínas intracelulares.

Outra característica patológica importante da doença é a acentuada astrocitose (Eddleston e Mucke, 1993; Barbeito et al., 2004). Por serem os astrócitos células que tem importante função na manutenção de condições adequadas ao microambiente neuronal, tem sido sugerido que estas células podem participar ativamente na patogenia da doença (Shaw, 1994; Rothstein et al., 1996).

Além disso, o estresse oxidativo parece estar também intimamente relacionado à doença, através de uma cascata de eventos que levaria à formação de produtos neurotóxicos capazes de promover a neurodegeneração. Estes produtos podem ser gerados por disfunção em uma enzima antioxidante, a cobre/zinco superóxido dismutase (SOD1), relacionada a alguns casos da doença em sua forma familiar por excitotoxicidade ou ainda disfunção mitocondrial (Simpson et al., 2003; Manfredi e Xu, 2005).

Alterações nas concentrações protéicas ou aumento na expressão de fatores relacionados ao estresse oxidativo na medula espinhal, no líquido cefalorraquidiano, ou no soro dos portadores de ELA podem refletir os processos patológicos da doença. Nossa pesquisa tem como objetivo: 1) avaliar a presença da ubiquitina e do proteasoma 26S em medula espinhal de portadores de ELA, e de pacientes-controle e 2) avaliar a expressão de proteínas e fatores relacionados ao estresse oxidativo no líquido cefalorraquidiano e no sangue de pacientes portadores da doença. As alterações encontradas poderão ser úteis no diagnóstico da doença e importantes para a avaliar a aplicação de agentes terapêuticos que possam retardar sua progressão.

I. - INTRODUÇÃO

I.1 Esclerose Lateral Amiotrófica

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença degenerativa progressiva dos neurônios motores da medula espinhal, tronco cerebral e córtex cerebral, que se manifesta clinicamente por fraqueza e atrofia muscular e sinais degenerativos do trato córtico-espinhal, em combinações variáveis. Trata-se de uma doença de meia idade, em sua maior parte, que é fatal em 2 a 5 anos ou mais tempo em alguns casos (Julien, 2001; Bruijn et al., 2004; Strong, 2004).

A ELA foi descrita pela primeira vez em 1869 por Charcot e Joffroy. Estes dois médicos e cientistas relataram os achados clínicos e patológicos da doença e descreveram o envolvimento do tracto córtico-espinhal. Apenas em 1874 é que o termo ELA foi introduzido por Jean Martin Charcot, médico e cientista nascido na França, sendo o primeiro a ligar os sintomas com um grupo de células especificamente afetados pela doença - os neurônios motores.

A ELA, atualmente, recebe diferentes denominações em vários países, como por exemplo, na França a doença ficou conhecida como "*Doença de Charcot*". Nos EUA a doença é conhecida como "*Doença de Lou Gehrig*", levando este nome porque um famoso jogador de basebol, *Lou Gehrig*, morreu em consequência da doença em 1941. Na Inglaterra, a ELA é conhecida como "*Doença do Neurônio Motor*" (Julien, 2001).

A ELA é uma doença com incidência anual de 1,5 por 100.000 pessoas no mundo inteiro (Louvel et al., 1997) sendo que se tem observado ao longo dos anos uma tendência ao aumento do número de pessoas afetadas pela doença (Strong, 2004). Os homens são comprometidos com uma frequência um pouco maior que as mulheres. A maioria dos pacientes tem mais de 50 anos e

o surgimento dos sintomas e a incidência aumentam a cada década. Esta doença tem um padrão aleatório no mundo, salvo por três regiões caracterizadas pela drástica aglomeração de pacientes onde muitas vezes a doença associa-se à demência e Parkinsonismo: os Chamorros das ilhas Marianas (Figlewicz et al., 1994), os residentes das tribos Auyu e Jakai da Nova Guiné (Gajdusek e Salazar, 1982) e residentes da península de Kii no Japão (Yoshida et al., 1998).

A baixa frequência da doença sugere uma inerente susceptibilidade em pacientes que estão destinados a desenvolver a doença em um momento particular da vida subsequente a um evento desencadeador (Louvel et al., 1997). Após esse evento, não há uma evidência clara de anormalidades neuropatológicas, neurofisiológicas ou clínicas que marcariam um paciente como potencialmente suscetível a ELA (Louvel et al., 1997).

A degeneração progressiva dos neurônios motores superiores e inferiores é a marca patológica desta doença e os sinais clínicos refletem isso. Fraqueza progressiva conduz à atrofia muscular, paralisia e morte, usualmente por falência respiratória, em aproximadamente cinco anos. Mais de 50% dos motoneurônios podem degenerar antes dos sinais clínicos aparecerem. Funções cognitivas e sensitivas não são afetadas na grande maioria dos casos e alguns grupos de neurônios motores, incluindo os dos núcleos do oculomotor e de Onuf, também são poupados, como descrito por Louvel e colaboradores, em 1997.

Sinais de lesão dos neurônios motores superiores são encontrados em todos os casos de ELA, exceto em raros casos em que existe predominância no envolvimento dos neurônios motores inferiores que mascara esses sinais. As manifestações usuais do envolvimento dos neurônios motores superiores consistem em hiperatividade dos reflexos musculares profundos dos membros, tanto superiores como inferiores, clônus no tornozelo e, às vezes, na patela, leve a moderada espasticidade e frequentemente reflexos patológicos (Hirano, 1996).

Hiperatividade dos reflexos musculares profundos na presença de músculos atroficos e paréticos é uma característica comum encontrada na ELA. Isto é visto nos braços, onde a doença ordinariamente inicia, enquanto no mesmo estágio os músculos das pernas podem apresentar nenhuma fraqueza e apresentar espasticidade associada a um aumento dos reflexos profundos. Com a progressão da fraqueza, os reflexos hiperativos desaparecem e se sobrepõe a arreflexia. O grau de hiperatividade ou hipoatividade dos reflexos e o tônus muscular invariavelmente refletem a predominância do envolvimento dos neurônios motores superiores ou inferiores. Nos últimos estágios da ELA, os neurônios motores inferiores estão suficientemente envolvidos para obscurecer os sinais usuais da doença dos neurônios motores superiores. Os reflexos superficiais estão geralmente diminuídos, mas estão mantidos; freqüentemente, o sinal de Babinski não aparece mesmo na presença de hiperreflexia viva. Alterações cognitivas são incomuns (Hirano, 1996; Lee e Cleveland, 1996).

O diagnóstico da ELA é baseado nas características clínicas e ou nos achados neuropatológicos após o óbito do portador da doença (Hirano, 1996; Cudkowicz et al., 2004). Em relação ao aspecto clínico, os exames complementares são úteis para realização do diagnóstico diferencial, porém, não existem exames de imagem ou laboratoriais específicos para o diagnóstico da doença. Várias desordens devem ser descartadas antes da definição do diagnóstico de ELA: desordens estruturais, como a mal-formação de Arnold-Chiari, mielopatia espondilótica cervical e siringomielia; outras desordens dos neurônios motores, degenerativas ou desmielinizantes, como a esclerose lateral primária, paraparesia espástica hereditária, neuropatia motora multifocal, esclerose múltipla e neuropatias desmielinizantes; desordens metabólicas e tóxicas ou infecções (Pradat e Bruneteau, 2006; Vial, 2006).

Em 1990, em um consenso internacional, foi implementado o “El Escorial criteria” para diagnóstico da ELA, com a intenção de proporcionar um padrão confiável de análise dos sinais

apresentados pelos portadores da doença, diminuindo assim o risco de diagnósticos falso-positivos ou falso-negativos e aumentando as possibilidades de um diagnóstico precoce. Este critério foi publicado em 1994 por Brooks, sendo revisado por Brooks e colaboradores em 2000. Este critério divide os casos em quatro categorias: ELA definida, ELA provável, ELA possível ou suspeita de ELA e encontra-se mais detalhado na tabela 1.

Tabela 1

ELA definida	Sinais de degeneração dos neurônios motores superiores e inferiores em pelo menos três regiões.
ELA provável	Sinais de degeneração dos neurônios motores superiores e inferiores em duas regiões.
ELA possível	Sinais de degeneração dos neurônios motores superiores e inferiores em uma região ou sinais de degeneração apenas dos neurônios motores superiores em duas ou três regiões.
ELA suspeita	Sinais de degeneração dos neurônios motores inferiores em duas ou três regiões.

Critério diagnóstico para ELA baseado no consenso internacional de 1990.

Os achados neuropatológicos em pacientes com ELA clássica são bastante distintos, com perda e degeneração das grandes células do corno anterior da medula espinhal, dos núcleos motores do tronco cerebral e das células de Betz no córtex motor, acompanhada de extensa

gliose; há desmielinização das raízes anteriores da medula espinhal e os músculos estriados exibem pronunciada atrofia (Ellison et al., 1998).

No tecido do portador de ELA observa-se, como dito anteriormente, perda e degeneração das grandes células do corno anterior da medula espinhal, dos núcleos motores do tronco cerebral e das células de Betz no córtex motor (Ellison et al., 1998). Na medula espinhal a perda de neurônios é mais proeminente nas regiões cervical e lombar (Julien, 2001). Macroscopicamente é possível observar atrofia e uma coloração acinzentada das raízes anteriores da medula espinhal que reflete a perda de fibras mielínicas. No tronco encefálico a maior parte dos núcleos exibe degeneração de seus respectivos neurônios motores, com exceção do núcleo de Onuf e os núcleos motores dos terceiro, quarto e sexto nervos cranianos, responsáveis pela inervação dos músculos do globo ocular (Julien, 2001). Ocasionalmente, nos casos graves ou de longa duração pode ser encontrada atrofia do giro pré-central (Brownell et al., 1970). A degeneração dos neurônios motores é acompanhada de extensa gliose, caracterizada por aumento tanto do número de astrócitos quanto de microglia (Kushner et al., 1991; Aquilonius et al., 1992). Há uma forma disseminada de atrofia muscular neurogênica na qual as fibras musculares exibem atrofia com perda da estriação transversal, um aumento relativo do número de núcleos, aumento de tecido conjuntivo e uma reposição de gordura no lugar das fibras musculares que pode obscurecer a atrofia. (Ellison et al., 1998). A distribuição dos achados patológicos está diretamente relacionada com os sintomas.

I.1.1 - Etiopatogenia

A etiologia da ELA ainda não é conhecida, porém existem várias hipóteses sugeridas como vias para o desenvolvimento da doença. Alguns possíveis mecanismos patogênicos são descritos para ELA, mas essas alterações podem não ser eventos desencadeadores diretos, ao contrário, podem ser parte de uma cascata de eventos desencadeados por uma causa primária.

Há evidências sugerindo que diversos processos bioquímicos podem estar associados à degeneração neuronal, tais como: mutações, excitotoxicidade, envolvimento de células não-neurais, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e apoptose. A interação destes eventos pode conduzir a anormalidades intracelulares e conseqüente morte celular (figura 1).

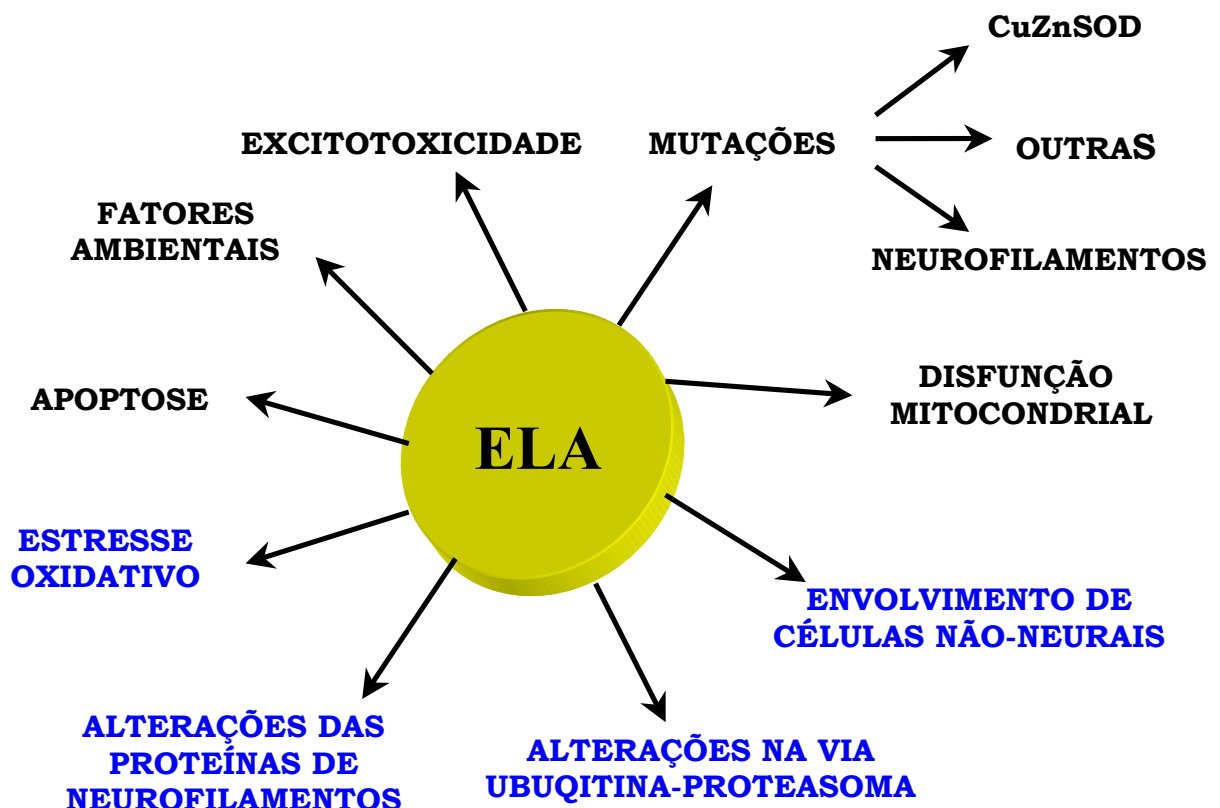


Figura 1. Esquema dos possíveis fatores etiopatogênicos da ELA. Em azul destacamos os fatores que foram avaliados no presente trabalho.

Algumas ou todas essas teorias podem ser causas participativas na degeneração do neurônio motor, podendo portanto ser correto dizer que a ELA é uma doença multifatorial.

I.1.1.1 – Características neuropatológicas principais

Os neurônios motores remanescentes após a instalação da ELA podem apresentar anormalidades no citoesqueleto e inclusões intracitoplasmáticas (Ellison et al., 1998). Os neurônios podem apresentar-se balonados, atróficos ou com núcleo e substância de Nissl deslocados em direção oposta às inclusões. Dilatações axonais (esferóides) podem estar presentes nos neurônios dos cornos anteriores da medula espinhal (Carpenter, 1968). Os esferóides são estruturas arredondadas representativas de dilatações axonais. Estas dilatações estão frequentemente preenchidas por acúmulos de proteínas de neurofilamentos (Mendonça et al., 2005) e periferina (He e Hais, 2004; Lariviere e Julien, 2004).

I.1.1.2 – Aspectos Genéticos

A ELA ocorre na forma esporádica ou na forma familiar. A forma esporádica é responsável por 90% dos casos. A forma familiar constitui 10% de todos os casos (Bredesen et al., 1996; Tu et al., 1996, Louvel et al., 1997; Strong, 2005). Os casos familiares não diferem dos não-

familiares com relação aos sintomas e evolução clínica, embora os primeiros, como grupo, apresentem um início em idade um pouco mais jovem.

Em termos de etiologia a ELA tem se mostrado uma doença complicada e extremamente difícil de se tratar efetivamente. Um maior entendimento da ELA veio em 1993, com a descoberta de Rosen e colaboradores de que alguns casos de ELA familiar são associados a mutações no gene que codifica a enzima SOD1, no cromossomo 21. A superóxido dismutase é uma enzima chave em mecanismos antioxidantes. Esta enzima tem sítios de ligação para cobre e zinco e após atividades de redução e oxidação do cobre, a enzima converte superóxido, um produto da fosforilação oxidativa na mitocôndria, em peróxido de hidrogênio. Os radicais superóxido são produtos tóxicos do metabolismo celular e são extremamente reativos podendo causar danos celulares irreversíveis. A instabilidade da enzima mutante contribui para a toxicidade que, às vezes, é aumentada pela liberação de zinco.

Muitas informações sobre a patogênese da ELA são provenientes de estudos em animais transgênicos para SOD1. Animais transgênicos portadores de mutação nesta enzima desenvolvem doença do neurônio motor através de atividades tóxicas. Um mecanismo sugerido refere-se ao fato de que a enzima SOD1 mutante é instável, permitindo interações químicas anormais com substratos não convencionais. Por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou o peroxinitrito ($ONOO^-$) poderiam reagir com SOD1 em seu estado reduzido ($SOD1^-Cu^+$) e catalisar a nitração de resíduos de tirosina (Strong, 2005; Pasinelli e Brown, 2006). Outra possibilidade seria relativa à interação anormal do oxigênio com SOD1 deficiente de zinco gerando um excesso de radicais superóxido (O_2^-) (Strong, 2005; Pasinelli e Brown, 2006). A enzima instável também poderia liberar zinco e cobre, que livres podem ser tóxicos. Em outro mecanismo sugerido, a enzima SOD1 instável e com sua conformação alterada também poderia formar depósitos protéicos tóxicos. Além disso, acúmulo de SOD1 poderia inibir a atividade do proteasoma, com

conseqüente aglomeração protéica. Esses agregados protéicos também poderiam sequestrar, inativar ou aumentar a atividade tóxica de outras proteínas participantes de processos celulares cruciais, como por exemplo proteínas anti-apoptóticas (figura 2). De fato, o trabalho de Pasinelli e colaboradores (2004) demonstra que a enzima SOD1 mutante sequestra a proteína anti-apoptótica Bcl2.

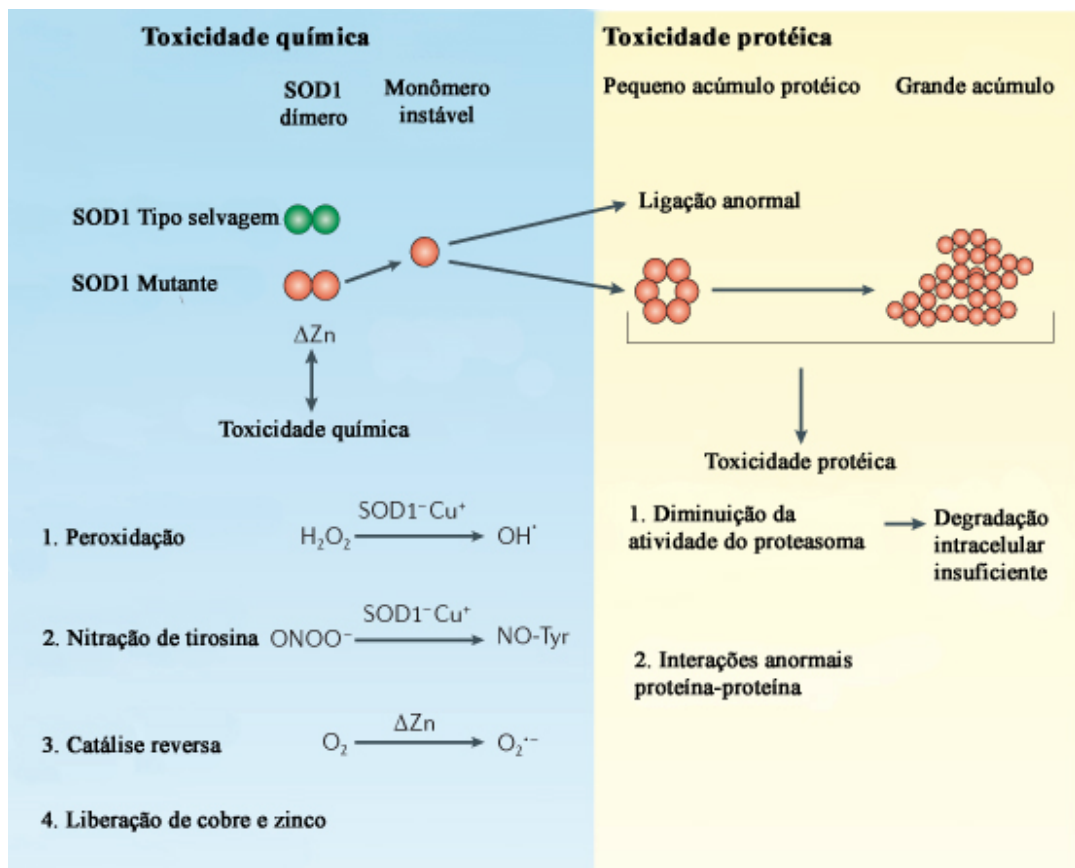


Figura 2. Esquema representativo das alterações celulares provocadas pela enzima SOD1 mutante. No modelo de toxicidade química, a instabilidade da enzima mutante contribuiria para a toxicidade, às vezes, acentuada pela liberação de zinco. É possível que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou peroxinitrito ($ONOO^-$) reaja com a enzima mutante. O oxigênio também pode reagir com a enzima e gerar excesso de ânions superóxido. A enzima instável também poderia liberar cobre e zinco que, por sua vez, são elementos tóxicos. No modelo de toxicidade protéica, a enzima SOD1 mutante poderia formar depósitos protéicos. Agregados de SOD1 poderiam inibir a atividade do proteasoma gerando acúmulo de proteínas. Reproduzido e adaptado a partir de Pasinelli e Brown, 2006.

Portanto, duas hipóteses são sugeridas para explicar os prejuízos funcionais gerados pela enzima SOD1 mutante: distúrbios no metabolismo do oxigênio ou instabilidade conformacional induzida pela mutação. Em ambos os casos, distúrbios relacionados às propriedades biofísicas e bioquímicas da enzima SOD1 induzem diversos fenômenos patogênicos, como: alterações no DNA/RNA, alterações nas mitocôndrias (diminuição na produção de ATP e tamponamento de cálcio), alterações nas proteínas de neurofilamentos e transporte axonal, e alterações nas funções do retículo endoplasmático, complexo de Golgi e na via ubiquitina-proteasoma (figura 3).

Segundo Pasinelli e Brown (2006), a partir destas alterações, cascatas apoptóticas são iniciadas. Esse processo relacionado à alteração em SOD1 também envolveria a ativação e disfunção dos astrócitos e células da microglia. O tamponamento de glutamato pelos astrócitos seria modificado, contribuindo para o aumento extracelular excessivo de glutamato e excitotoxicidade. As células da microglia secretariam fatores que poderiam ser tóxicos e causar danos celulares. A morte neuronal envolveria complexos fenômenos intrínsecos e extrínsecos aos neurônios motores.

Uma mutação no gene que codifica uma proteína denominada alsina em pacientes portadores de ELA familiar foi descrita por Hadano e colaboradores em 2001. A alsina é uma proteína que contém três domínios de liberação de um nucleotídeo de guanina e está envolvida com a ativação das proteínas pertencentes à subfamília da proteína Ras. As proteínas dessa subfamília estão relacionadas à regulação de sinalizações celulares importantes. A perda de alsina em camundongos não desencadeia a degeneração de neurônios motores, mas predispõe ao estresse oxidativo (Julien et al., 2005). Outras mutações tem sido identificadas, porém pouco caracterizadas (Strong, 2005).

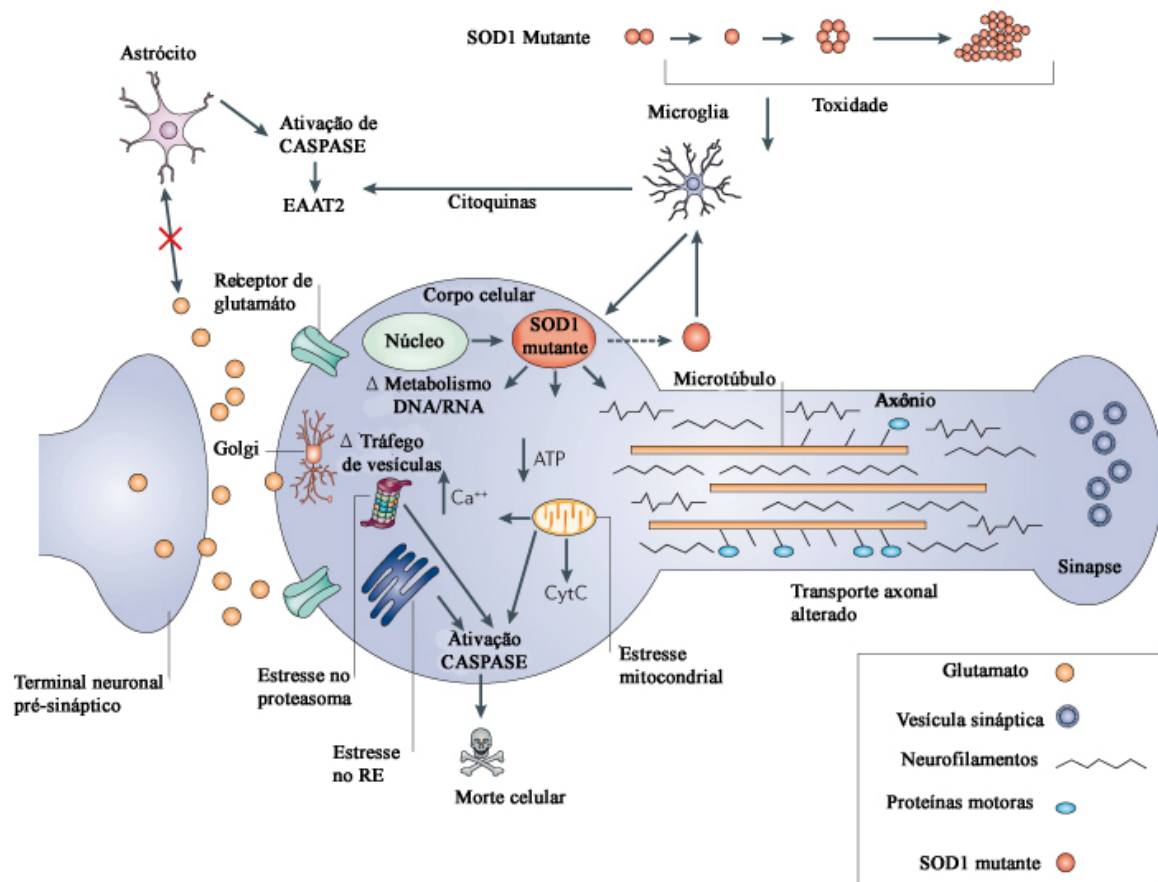


Figura 3. Esquema representativo das alterações celulares provocadas pela enzima SOD1 mutante. A toxicidade da enzima mutante é multifatorial, operando através de diversos caminhos, muitas vezes interligados. Dentro do neurônio motor, a enzima pode afetar o metabolismo do DNA/RNA, da mitocôndria (diminuição da produção de ATP e tamponamento de cálcio, aumentando a liberação de cálcio), dos neurofilamentos e transporte axonal e as funções do retículo endoplasmático, complexo de Golgi e proteossoma. Em interação com uma glicoproteína secretora, SOD1 poderia ser secretada do neurônio motor. O processo patológico envolve a ativação e disfunção de astrócitos e microglia. A captação de glutamato pelos astrócitos pode ser reduzida contribuindo para o aumento da concentração extracelular do neurotransmissor. A microglia secreta citocinas que podem ser tóxicas e causar danos celulares. Portanto, a morte celular na ELA reflete uma complexa interação entre fenômenos intrínsecos e extrínsecos. Reproduzido e adaptado a partir de Pasinelli e Brown, 2006.

O entendimento da patogênese da ELA tem evoluído majoritariamente em função dos estudos relacionados às mutações associadas à doença. Os achados clínicos e patológicos na ELA familiar associada com mutações em diferentes proteínas sugerem que o processo bioquímico que

leva à perda dos neurônios motores na ELA familiar é, em geral, o mesmo que na ELA esporádica (Bredesen et al., 1996; Rowland e Shneider, 2001). Estudos sobre o mecanismo patogênico em casos de ELA familiar podem, portanto, conduzir a uma maior compreensão dos casos esporádicos (Strong, 2005).

Em pacientes portadores de ELA esporádica têm sido identificadas mutações no gene que codifica a cadeia pesada de neurofilamento, como descrito nas revisões de Cleveland (1999), Bruijn e colaboradores (2004) e Strong (2004), mas tais mutações não têm sido descritas na forma familiar da doença.

I.1.1.3 – Animais transgênicos na ELA

Animais transgênicos que expressam alterações na enzima SOD1 tem sido foco de enorme interesse por desenvolverem um fenótipo característico da doença. Camundongos que expressam mutação em SOD1 também apresentam como característica patológica a presença de acúmulos anormais de neurofilamentos (Tu et al., 1996; Shibata, 2001). Várias linhas de animais transgênicos que expressam um gene mutante para SOD1 já foram estabelecidas (Gurney et al., 1994). O modelo animal mais comumente utilizado é o camundongo transgênico G93A. A enzima SOD1 neste animal possui um resíduo de glicina na posição 93 substituído por uma alanina.

Estudos com esses animais têm fornecido evidências de que a mutação em SOD1 causa ELA por um ganho de função tóxica. Entretanto, os mecanismos da doença causada pelas mutações em SOD1 não estão esclarecidos.

I.1.1.4 – Envolvimento não-neuronal

O conceito de que células não-neurais estariam envolvidas no processo patológico da doença se originou da observação de que a proliferação de células microgliais e astrócitos são eventos patológicos iniciais desta doença (McGeer et al. 1993; Schiffer et al., 1996). Vários marcadores neuroquímicos que evidenciam a ativação destas células têm sido observados em estudos realizados com material obtido de portadores de ELA (Almer et al., 2001; Mendonça et al., 2006) e em animais transgênicos (Hall et al., 1998; Boillée et al., 2006).

A proliferação de astrócitos observada na ELA tem sido foco de bastante interesse, principalmente em função das evidências de perda ou alterações nos transportadores gliais de glutamato-1 (GLT-1; EAAT2) em casos de ELA (Shaw et al., 1994; Rothstein et al., 1996). O aumento de glutamato na fenda sináptica parece ser um evento importante do processo que culmina com a morte neuronal. Existem evidências de alteração nos níveis de glutamato em casos de ELA (Belleruche e Recordati, 1984; Shaw, 1994; Spreux-Varoquaux et al., 2002). Os astrócitos, dentre várias funções, são responsáveis pela retirada do excesso de glutamato da fenda sináptica. Estas evidências conduzem à hipótese de que os astrócitos, de alguma forma, podem participar ativamente de eventos neurotóxicos mediados por glutamato que desencadeiem o processo patogênico e sejam críticos para a sobrevivência neuronal na ELA.

I.1.1.5 – Neuroquímica

Excitotoxicidade

O acúmulo anormal de glutamato pode ocorrer em portadores da doença (Rothstein et al., 1990). Há relatos de alterações nos níveis de glutamato no plasma, líquido cerebrospinal e cérebro de pacientes portadores de ELA retirados pós-morte (Belleruche e Recordati, 1984; Shaw, 1994; Spreux-Varoquaux et al., 2002). Este metabolismo anormal de glutamato pode contribuir para a neurodegeneração na ELA.

O glutamato é um neurotransmissor excitatório presente no sistema nervoso central. A despolarização do terminal pré-sináptico de um neurônio glutamatérgico faz com que haja liberação de glutamato em um processo dependente de cálcio. O glutamato liberado pode ativar dois tipos de receptores na membrana do elemento pós-sináptico: os receptores ionotrópicos, que são divididos em três grupos: receptores NMDA, receptores AMPA e receptores Kainato ou receptores metabotrópicos, que são receptores associados a mensageiros secundários (Alberts et al., 1993).

A função normal do glutamato na transmissão sináptica é rapidamente concluída após a retirada do excesso de glutamato da fenda sináptica que é realizada pelos transportadores presentes na membrana das células gliais. Se por algum motivo o glutamato não for retirado da fenda sináptica, ele irá provocar a entrada excessiva de cálcio no neurônio. Um excesso de íons cálcio é normalmente tamponado por calbindina, parvalbumina e pelas mitocôndrias, mas a entrada de cálcio não controlada, ativa várias enzimas, produzindo um excesso de óxido nítrico e superóxido. Isso posteriormente promove a produção de peroxinitrito, resultando na nitrosilação de resíduos de tirosina de proteínas neuronais-chave, como neurofilamentos e proteínas receptoras de fatores neurotróficos. Um aumento na quantidade de superóxido leva à produção de

mais radicais livres, causando injúria no DNA e estruturas da membrana celular. Como descrito por Leigh (1996), a excitotoxicidade é acompanhada por alterações histopatológicas, começando com edema no pericário e dendritos levando à destruição de organelas intracelulares, dano ao núcleo e morte celular.

A excitotoxicidade por glutamato, radicais livres e alterações no citoesqueleto não são processos independentes, mas processos celulares intimamente relacionados que levam à degeneração dos neurônios motores (Gutmann e Mitsumoto, 1996).

Estresse Oxidativo

Quando radicais livres estão presentes em excesso na célula, ocorrem danos celulares causados pelo efeito tóxico destes elementos. Esta condição é denominada estresse oxidativo. Radicais livres são moléculas instáveis, pelo fato de seus átomos possuírem um número ímpar de elétrons. Para atingir a estabilidade, estas moléculas reagem com outros elementos intracelulares para adquirir um elétron.

Os radicais livres formados em maior quantidade são chamados espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS são produzidas durante o processo de fosforilação oxidativa no interior da mitocôndria, a partir da redução de oxigênio à água. Estes radicais livres podem conduzir à morte celular por oxidação ou peroxidação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Chwiej et al., 2005).

Existem evidências que consideram o estresse oxidativo um elemento importante no processo da doença, já que a presença de injúria oxidativa na célula é clara: presença de peroxidação lipídica, presença de conjugados de proteínas ao elemento 4-hidroxinonenal, dano

oxidativo no DNA, observação da atividade de óxido nítrico sintase e formação de nitrotirosina, tanto com agregados de neurofilamentos quanto com agregados hialinos.

A enzima SOD1, em indivíduos normais, funciona como um seqüestrador de radicais livres, sendo responsável pela manutenção de parte da homeostasia intracelular. Alterações em seu mecanismo de funcionamento podem levar ao acúmulo de radicais livres na célula e conseqüente morte. Outro fator importante é o funcionamento correto da maquinaria mitocondrial. Alterações no funcionamento da mitocôndria podem conduzir a uma superprodução de radicais livres (Bacman et al., 2006), como descrito adiante.

Disfunção Mitocondrial

Vários estudos têm sido direcionados ao papel da mitocôndria na patogênese da ELA e de outras doenças neurodegenerativas. Evidências de disfunções mitocondriais e morfologia anormal da mitocôndria nos terminais de neurônios motores e músculos em casos de ELA esporádica têm sido identificadas (Manfredi e Xu, 2005). Em animais transgênicos, a principal evidência morfológica relacionada à mitocôndria é a presença de vacuolização mitocondrial, onde são observados vacúolos originados da separação entre as membranas mitocondriais interna e externa e estas alterações aumentam drasticamente com a progressão da doença (Kong e Xu, 1998; Bendotti et al., 2001; Sasaki et al., 2004).

Durante muitos anos, estudos indicaram que a enzima SOD1 mutante poderia afetar diretamente a mitocôndria, principalmente através da formação de agregados protéicos no interior da organela. O acúmulo de SOD1 mutante no interior da mitocôndria causa dano direto através da formação de edema, com aumento da permeabilidade da membrana externa e espaço intermembranar, levando à liberação de citocromo-c e ativação de caspases, inibição do

complexo importador de proteínas (TOM) e interação anormal com proteínas mitocondriais como a Bcl2 (figura 4).

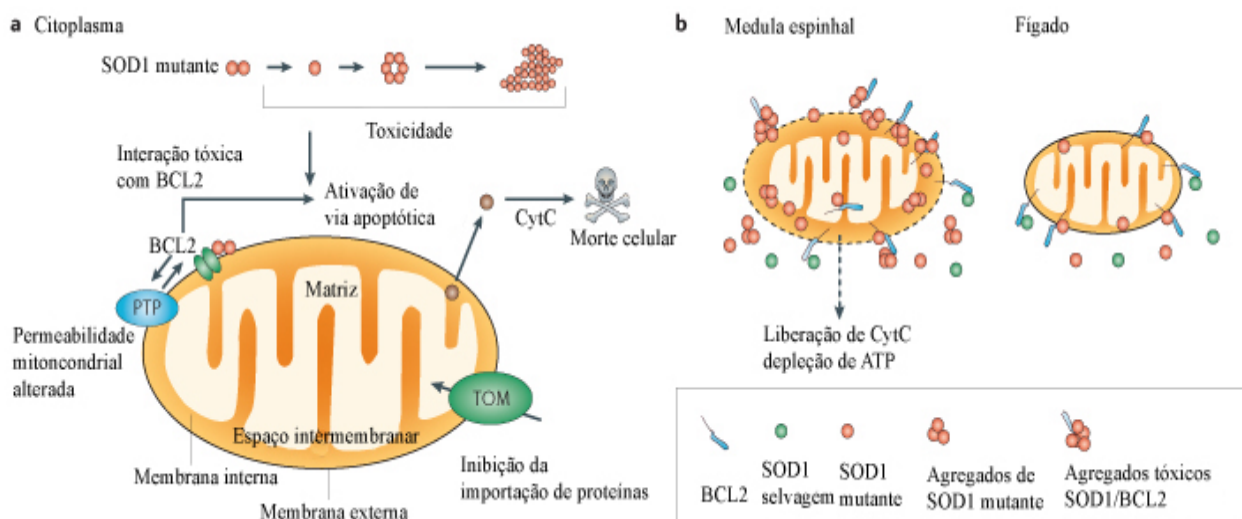


Figura 4. Esquema representativo das alterações mitocondriais provocadas pela enzima SOD1 mutante. Há muito tempo considerada uma proteína citoplasmática, SOD1 também é encontrada na mitocôndria (membrana externa, membrana interna e matriz mitocondrial). **a)** SOD1 mutante forma agregados insolúveis que poderiam diretamente danificar as mitocôndria por: edema, a partir da expansão e aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial externa e espaço intermembranar, levando a liberação de citocromo c (CytC) e ativação de caspases; inibição do complexo translocador mitocondrial (TOM) evitando a importação de proteínas; e interações anormais com proteínas mitocondriais como a Bcl2. **b)** Agregados de SOD1 e Bcl2 são encontrados em mitocôndrias na medula espinhal e não no fígado de animais transgênicos, um achado que deve estar relacionado à especificidade do neurônio motor. A deposição conjugada de SOD1 e Bcl2 deve anular a função de Bcl2, rompendo a membrana mitocondrial, esgotando energia, desorganizando a bioenergética mitocondrial e ativando apoptose. Reproduzido e adaptado a partir Pasinelli e Brown, 2006.

Em cultura de células de animais transgênicos para ELA observa-se despolarização da mitocôndria (Rizzardini et al., 2006), prejuízo na homeostasia do cálcio, pela liberação de citocromo-c, (Damiano et al., 2006) e redução na produção de ATP (Menzies et al., 2002). Se a disfunção mitocondrial representa um evento primário ou secundário na patogênese da doença

ainda não se sabe, já que as alterações mitocondriais podem originar ou ser originadas de eventos tóxicos. De qualquer maneira, estas alterações mitocondriais podem mediar a morte celular a partir da liberação de cálcio no citoplasma, produção inadequada de ATP e ativação de eventos que culminariam com a apoptose.

Desorganização do Citoesqueleto

Dentre as características histopatológicas-chave da ELA destaca-se o enorme acúmulo de proteínas, incluindo agregados de neurofilamentos, no corpo celular e em segmentos axonais proximais, e inclusões intracitoplasmáticas positivas para ubiquitina (Deslile e Carpenter, 1984; Julien, 2001). Em trabalho anterior, nosso grupo identificou a presença de neurofilamentos em casos de ELA. Através de imunohistoquímica, foram observados densos acúmulos focais da proteína em regiões do corpo celular neuronal. Por análise quantitativa evidenciou-se que a subunidade pesada dos neurofilamentos apresentava envolvimento predominante quando comparada às outras subunidades (Mendonça et al., 2005). O acúmulo de neurofilamento pode ser desencadeado por diversos mecanismos e, como consequência, conduzir a um prejuízo no transporte axonal, que pode ser fatal para o neurônio. Trabalhos anteriores descrevem a redução do transporte axonal em pacientes com ELA (Sasaki e Iwata, 1996) e em modelos animais transgênicos da doença (Sasaki et al., 2005). O transporte de moléculas e organelas é um processo celular fundamental que é particularmente importante para o desenvolvimento, função e sobrevivência dos neurônios (figura 5).

Estes agregados protéicos podem desempenhar um papel essencial na degeneração dos neurônios motores na doença. Acredita-se que a expressão biológica final do processo patogênico seja o acúmulo progressivo de elementos que culmina com a morte neuronal (Strong et al., 2005)

e o entendimento do mecanismo que conduz a este acúmulo seria um instrumento valioso para maior conhecimento desta doença.

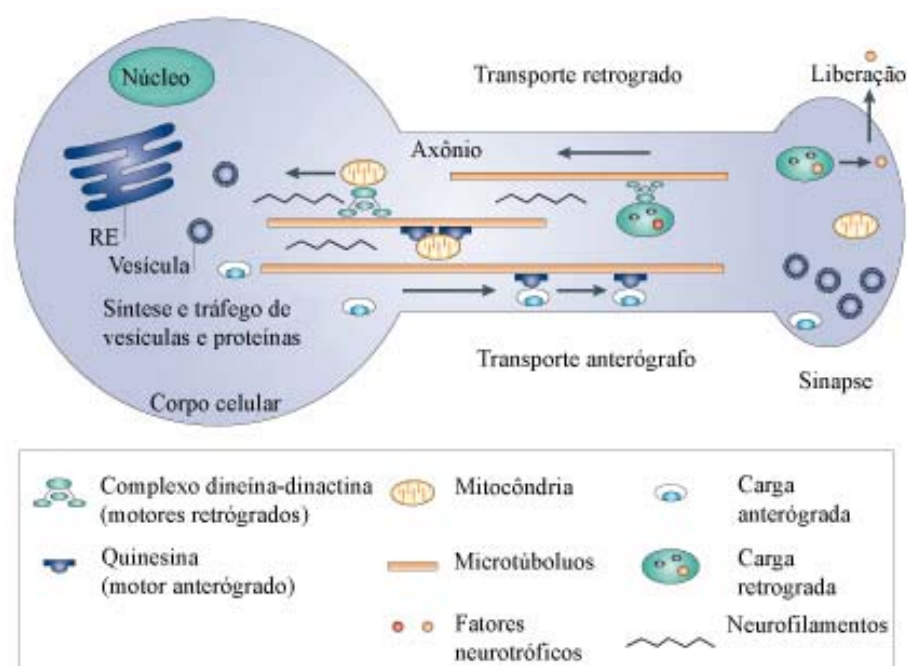


Figura 5. O transporte axonal ocorre de forma anormal na ELA. Alteração dos neurofilamentos por mutações e ou mudanças em sua fosforilação podem afetar a estrutura do axônio podendo, por sua vez, afetar o transporte axonal. Reproduzido e adaptado a partir de Pasinelli e Brown, 2006.

Os neurofilamentos têm sido identificados como moduladores do transporte por serem responsáveis pela regulação do calibre axonal (Hirokawa et al., 1984). Vários achados têm indicado que alterações no transporte axonal podem contribuir para a morte dos neurônios motores na ELA (Sasaki e Iwata., 1996). Tanto o transporte axonal anterógrado quanto o

retrogrado estão diminuídos em modelos animais transgênicos da doença (Sasaki et al., 2005). Esses déficits são exacerbados com a progressão da doença. Vários autores sugerem que agregados de neurofilamentos em axônios proximais (esferóides) podem comprometer fisicamente o transporte axonal (Sasaki e Iwata, 1996).

Os neurofilamentos são compostos por três subunidades possuindo pesos moleculares com cerca de 70, 145-160 e 200 kDa, referindo-se ao neurofilamento leve (NF-L), neurofilamento médio (NF-M) e neurofilamento pesado (NF-H), respectivamente (Hoffman e Lasek, 1975; Schlaepfer e Freeman, 1978; Napolitano et al., 1987). São os elementos do citoesqueleto neuronal mais numerosos (Hoffman et al., 1984; Lee e Cleveland, 1996). Junto com outras proteínas fibrosas, os neurofilamentos formam uma rede filamentosa tridimensional que sustenta a célula nervosa, auxiliando a definir sua forma, organizar e ancorar constituintes dentro do citoplasma (Hirokawa et al., 1984).

As características que mais diferem as subunidades de neurofilamentos são suas regiões de domínio carboxi-terminal. Essas são regiões estruturalmente heterogêneas e isso talvez possa explicar diferentes propriedades bioquímicas e imunológicas entre os vários tipos de filamentos intermediários (Fuchs e Hanukoglu, 1983; Harris et al., 1991). Para o NF-L, essa região é muito ácida, com muitos resíduos de ácido glutâmico; NF-M tem um domínio carboxi-terminal maior do que o NF-L, contendo segmentos ricos em ácido glutâmico e lisinas, além de possuir algumas repetições de lisina-serina-prolina (KSP). A região carboxi-terminal do NF-H é distinta dos outros filamentos intermediários, devido à presença de 42 a 52 repetições de KSP, organizadas em perfeita ordem. As regiões KSP são potentes sítios de fosforilação. A fosforilação ocorre na proporção do número de repetições KSP, portanto o NF-H é o mais extensamente fosforilado e o NF-L, menos (Julien e Mushynski, 1982; Ackerley et al., 2004).

Sendo assim, as proteínas de neurofilamentos parecem conter um centro composto pelas três subunidades, enquanto o domínio carboxi-terminal das subunidades média e pesada parecem compor projeções laterais (figura 6), as quais, acredita-se devem modular o espaço entre os filamentos, contribuindo para a regulação do calibre axonal (Carden et al., 1987; Heins et al., 1993; Garcia et al., 2003) e, possivelmente, desempenham um papel no transporte axonal.

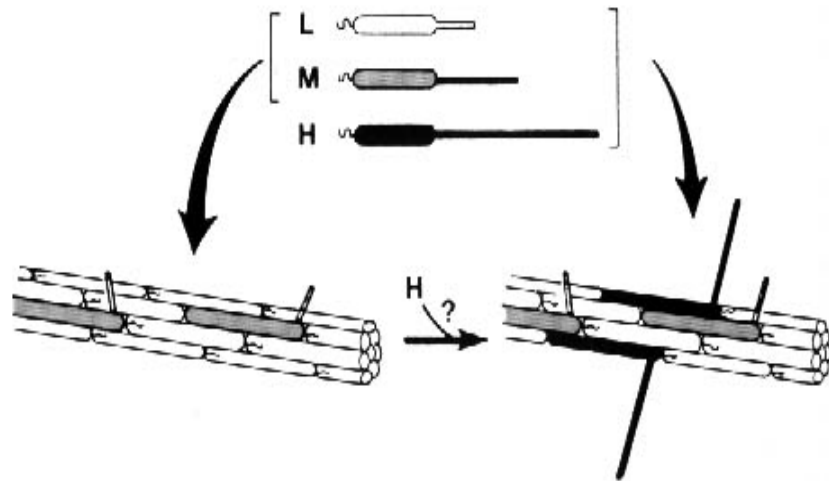


Figura 6. Composição dos neurofilamentos axonais nos estados imaturo (esquerda) e maduro (direita). As subunidades de neurofilamento leve (L), médio (M) e pesado (H) juntas formam o neurofilamento. A subunidade L está presente no eixo do filamento enquanto que as subunidades M e H estão localizadas na periferia do filamento e suas extremidades carboxiterminal dão origem às projeções laterais. Note que os axônios maduros contêm subunidades de NF-H com longas projeções laterais fosforiladas. Reproduzido a partir de Nixon e Sihag, 1991.

A chave para o entendimento da formação de agregados de neurofilamentos é compreender o papel da alteração da fosforilação protéica. A fosforilação das proteínas do citoesqueleto é regulada de forma precisa no sistema nervoso sob condições fisiológicas.

Particularmente, os neurofilamentos e proteínas associadas a microtúbulos são extensamente fosforiladas. Contudo essa extensa fosforilação ocorre majoritariamente no compartimento axonal, enquanto no corpo celular há pouca ou nenhuma destas proteínas em seu estado fosforilado (Lee e Cleveland, 1996; Julien, 1999).

As cinases estão surgindo como fortes contribuintes para a patogênese da ELA. Cdk5 é um membro da família das cinases dependentes de ciclina e tem forte atividade nos neurônios pós-mitóticos. Atualmente, o ativador da Cdk5 mais bem caracterizado é a p35. A regulação anormal de Cdk5 por p25 ou p29 contribui para a neurodegeneração por alterar o estado de fosforilação das proteínas de citoesqueleto. p35 é o maior ativador desta cinase. Vários eventos levam ao aumento dos níveis de cálcio no citoplasma, o que, por sua vez, resulta na ativação das calpaínas, proteases ativadas por cálcio. A atividade das calpaínas induz a quebra da p35 a p25. Portanto, há uma desregulação de Cdk5 é desregulada sob condições patológicas e induz a fosforilação anormal das proteínas do citoesqueleto (Strong, 2005).

Segundo Strong (2005) a fosforilação dos neurofilamentos ocorre no axônio em íntima proximidade com a bainha de mielina, sendo possível sugerir que a mielinização pode ser um sinal ativador para esta fosforilação. É possível que a sinalização das células de Schwann ou oligodendrócitos possa ativar a Cdk5 e outras cinases como ERK1/2. Apesar de as moléculas específicas das células mielinizantes e os mecanismos que regulam as cascatas de sinalização que afetam a expressão e fosforilação dos elementos do citoesqueleto não terem ainda sido bem identificadas, a glicoproteína associada à mielina (MAG) é um potencial ligante neuronal capaz de mediar tanto eventos gliais como neuronais (Schachner e Bartsch, 2000). Camundongos nocautes para MAG exibem diminuição da fosforilação de neurofilamentos em associação com diminuição da atividade de Cdk5 e ERK1/2 (Pan et al., 2005). Neurônios do gânglio da raiz dorsal em co-cultura com células transfectadas com MAG apresentam aumento na quantidade de

NFs, MAP1B, MAP2 e tau, acompanhado de elevação da expressão de NF-H e NF-M fosforilados. Estes eventos estão associados à elevação da atividade de Cdk5 e ERK1/2 (Domeniconi e Filbini, 2005). Estes achados conduziram à idéia de que interações entre MAG e o axônio induzem uma cascata de sinalização que regula a expressão de proteínas do citoesqueleto e sua fosforilação diretamente por estas cinases (Dashiel et al., 2002) (figura 7).

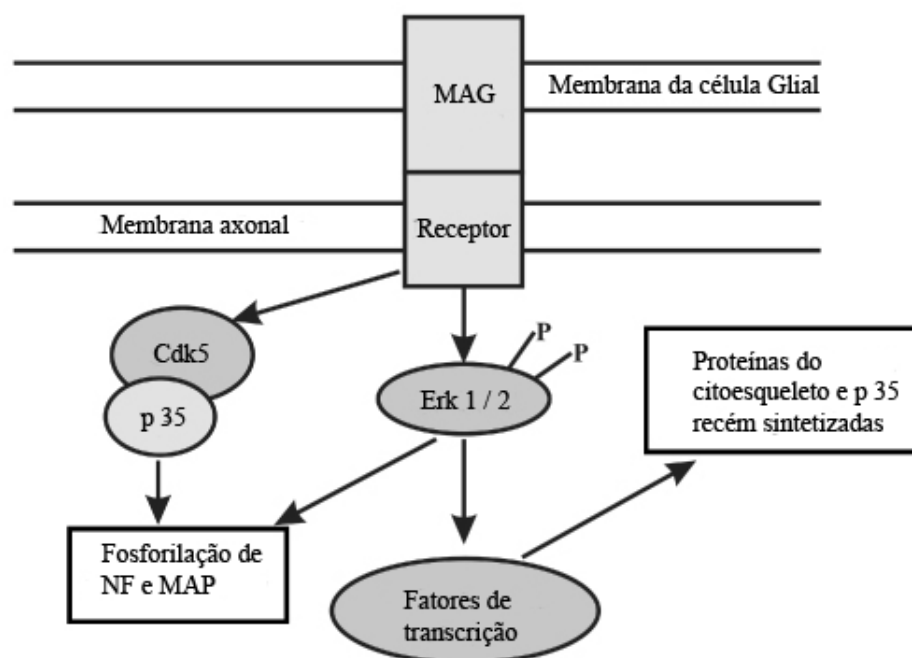


Figura 7. Desenho esquemático exibindo a regulação da fosforilação de proteínas do citoesqueleto em axônios mielinizados sob condições normais. Estudos indicam que a glicoproteína associada à mielina (MAG) pode ser responsável pela fosforilação de proteínas do citoesqueleto através da ativação de cinases localizadas no compartimento axonal (Cdk5 e Erk 1/2). Reproduzido e adaptado a partir de Strong et al., 2005.

O equilíbrio entre as proteinocinases e as proteinofosfatases regula a fosforilação das proteínas do citoesqueleto. O influxo de cálcio no neurônio após a despolarização da membrana

leva à ativação de Ras e a subsequente ativação de c-Raf. c-Raf ativa MEK1/2 que fosforila ERK1/2. A ativação de ERK1/2 leva a fosforilação das proteínas do citoesqueleto, incluindo NF, tau e MAPs. A sinalização celular resultante disso leva à fosforilação por p35/Cdk5 (figura 8). Então, as vias de regulação da atividade de Cdk5 e ERK1/2 são críticas na manutenção da fosforilação normal das proteínas do citoesqueleto e quando esta regulação é perdida nas doenças neurodegenerativas, a atividade destas cinases é desregulada podendo levar à hiperfosforilação anormal destas proteínas.

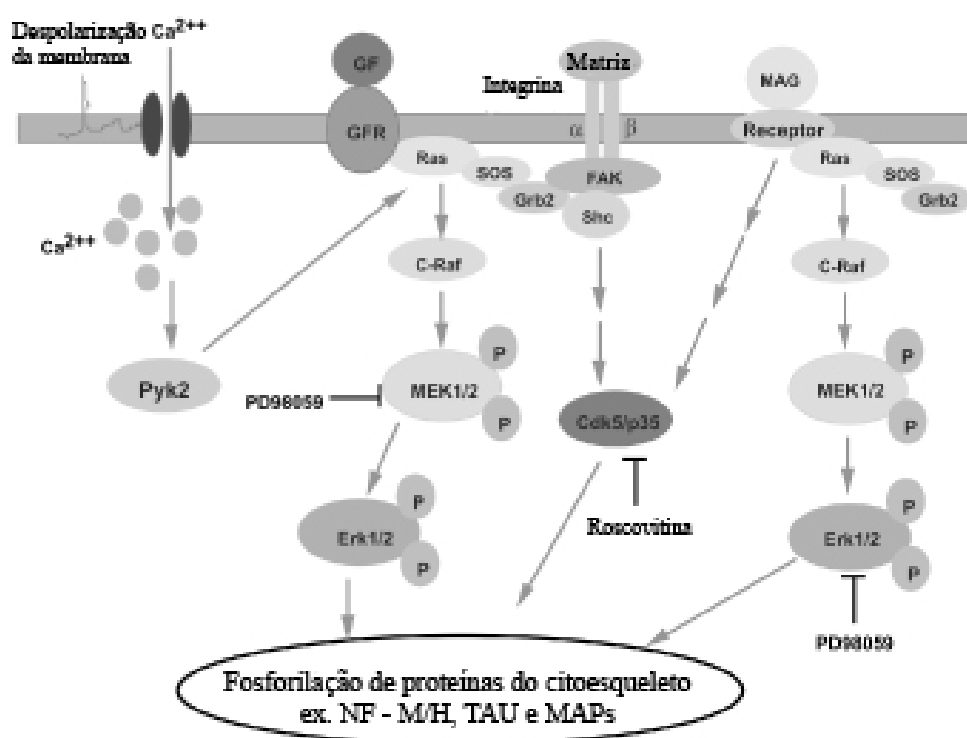


Figura 8. Desenho esquemático representando as vias de sinalização para a fosforilação de proteínas do citoesqueleto sob condições fisiológicas. Os sinais relacionados à ativação de cinases que culminam com a fosforilação de proteínas do citoesqueleto podem ser: influxo de cálcio a partir da despolarização da membrana, ligação de fatores de crescimento e da matriz extracelular aos seus receptores, assim como interação entre neurônios e células da glia. Reproduzido e adaptado a partir de Strong et al., 2005.

As interações axônio-glia nos processos de fosforilação também são responsáveis pela regulação dessas cascatas de cinases. Na fosforilação normal há grandes níveis de tirosina fosfatases no corpo celular e baixos níveis no axônio. Isto resulta em menores níveis de fosforilação das proteínas do citoesqueleto no corpo celular e fosforilação elevada no axônio. É possível admitir que sob condições fisiológicas os receptores de cinase são menos expressos no corpo celular como resultado de alta expressão e atividade das tirosina fosfatases. Entretanto, há menor expressão e atividade destas fosfatases no compartimento axonal resultando em maior ativação de receptores. Em adição, a interação glia-axonio ativa as cinases no axônio (figura 9).

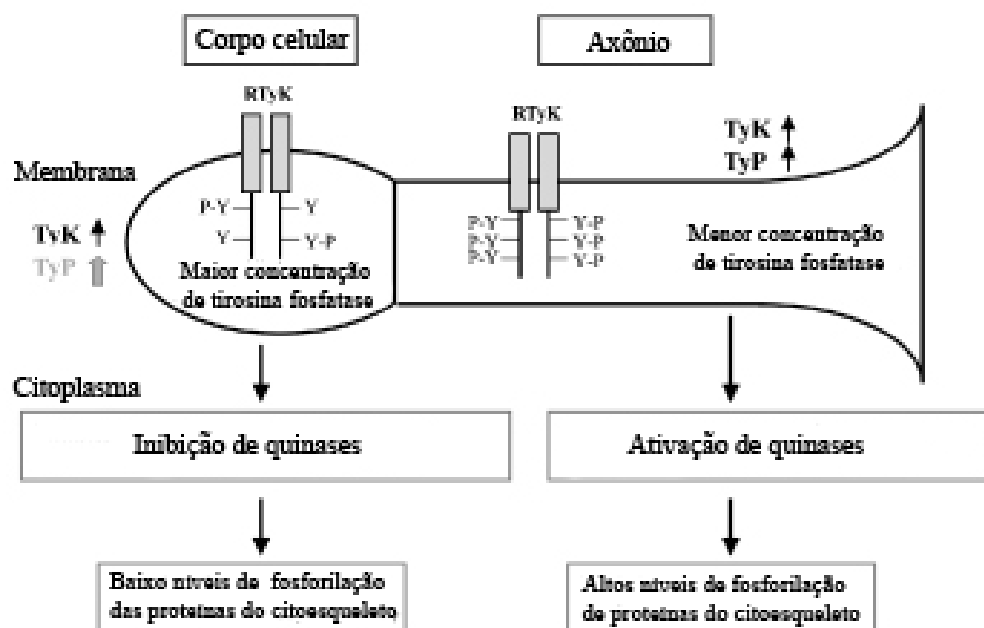


Figura 9. Desenho esquemático representando a regulação da fosforilação de proteínas do citoesqueleto sob condições fisiológicas. A fosforilação de proteínas é regulada a partir de um adequado equilíbrio entre as atividades de cinases (TyK) e fosfatases (TyP) no compartimento neuronal. A menor atividade dos receptores para cinases (RTyK) no corpo celular talvez seja o resultado de maior atividade de fosfatases neste compartimento comparado com o compartimento axonal. Reproduzido e adaptado a partir de Strong et al., 2005.

Strong e colaboradores (2005) propõem que várias lesões induzem a desregulação desta fosforilação como resultado de uma ativação anormal da cascata de cinases durante condições patológicas. A desregulação das atividades enzimáticas resultam no aumento dos receptores tirosina cinase. Isto ativaria as cascatas serina/treonina cinase no corpo celular que causam maiores níveis de fosforilação das proteínas de citoesqueleto. A desregulação da atividade das cinases em processos patológicos pode conduzir à hiperfosforilação destas proteínas nas doenças neurodegenerativas.

Via Ubiquitina-Proteasoma

A maioria das doenças neurodegenerativas, como descrito anteriormente, são marcadas pela presença de proteínas agregadas ou corpos de inclusão. Isso inclui, por exemplo, o acúmulo de neurofilamentos na ELA (Seilhean et al., 2004; Bruijn et al., 2004; Mendonça et al., 2005), as placas amilóides e emaranhados neurofibrilares na doença de Alzheimer (Layfield et al., 2001), corpúsculos de Lewy na doença de Parkinson (Chung et al., 2001) assim como outras doenças neurodegenerativas. Recentes avanços na pesquisa das doenças neurológicas tem indicado que o sistema ubiquitina-proteasoma desempenha um papel importante na patogênese das doenças neurodegenerativas. Uma das primeiras evidências do envolvimento desse sistema nas doenças neurodegenerativas deve-se ao fato de acúmulos de proteínas em certas doenças neurodegenerativas serem positivas para ubiquitina (Schiffer et al., 1991; Mather et al., 1993; Schiffer et al., 1994; Watanabe et al., 2001).

A ubiquitina é abundante em neurônios e seu acúmulo pode ser identificado nos estágios iniciais das doenças. O envolvimento da ubiquitina na neurodegeneração é tão aceito que sua imunomarcagem é usada regularmente na identificação de lesões patológicas, como corpúsculos

de Lewy e emaranhados neurofibrilares (Alves-Rodrigues et al., 1998). Ainda não é compreendida a relação entre esse acúmulo de proteínas e a morte neuronal, porém o conhecimento dos constituintes dessas inclusões pode ser um indício sobre os eventos que levam à sua formação.

A presença da ubiquitina nas inclusões intracitoplasmáticas rendeu enorme interesse. Logo se buscou obter informações sobre a ubiquitina evidenciando-se o sistema ubiquitina-proteasoma. Tem havido muito progresso no entendimento da biologia do proteasoma, mas muito ainda há para ser esclarecido. O fato é que hoje se sabe que este sistema constitui uma via proteolítica e existem informações suficientes para acreditar no envolvimento direto ou indireto dessa via na patogênese de várias doenças. Porém, não se sabe se a via ubiquitina-proteasoma seria uma fonte primária ou secundária a um outro fator. A partir disso, várias hipóteses podem ser levantadas e vários trabalhos têm sido realizados na tentativa de elucidar um pouco mais o papel dessa via nas doenças neurodegenerativas. Uma idéia geral é que, sob certas condições adversas, incluindo estresse oxidativo, configuração anormal da proteína no retículo endoplasmático, estresse e idade, proteínas danificadas podem acumular-se na célula. Esse acúmulo pode ocorrer também devido a modificações pós-traducionais de proteínas recém sintetizadas, clivagem proteolítica anormal, diminuição da liberação de proteínas degradadas e/ou expressão imprópria ou ainda “splicing” gênico alterado (Chung et al., 2001; Layfield, 2001).

A ubiquitina existe na célula em uma forma livre ou covalentemente ligada a proteínas. É uma proteína pequena composta por 76 aminoácidos, constituinte de uma via responsável pela degradação de proteínas de vida curta, desnaturadas ou erroneamente montadas, bem como proteínas contendo aminoácidos oxidados ou qualquer tipo de aminoácidos anormais. A ubiquitina é conjugada a proteínas que devem ser degradadas por extensa cascata enzimática. Em um processo dependente de ATP, a ubiquitina é inicialmente ativada por enzimas ativadoras de

ubiquitina (E1). Em seguida, as moléculas de ubiquitina são transferidas a uma das várias E2s ou enzimas conjugantes de ubiquitina. As enzimas E2 fazem a ligação da região carboxi-terminal da ubiquitina ao grupo amina de uma lisina do substrato e, na maioria das vezes, essa etapa é auxiliada pelas enzimas E3 ou enzimas ligases. A conjugação sucessiva de ubiquitina a um resíduo de lisina de uma ubiquitina antecessora (K48-G76) resulta na formação de uma longa cadeia de proteínas de ubiquitina. Essa organização de proteínas é denominada de cadeia de multi-ubiquitina ou, simplesmente, poliubiquitina (Alves-Rodrigues et al., 1998; Lam et al., 2000; Zwickl e Baumeister, 2002).

Como dito anteriormente, a ubiquitina se une ao substrato através da formação de uma ligação isopeptídica entre a extremidade carboxi-terminal da ubiquitina e uma cadeia lateral de um resíduo de lisina do substrato e essa união é auxiliada por um enzima ligase (Alves-Rodrigues et al., 1998). A ligação do substrato à enzima ligase é específica e implica no fato de que essas enzimas desempenham um papel fundamental no reconhecimento e na seleção das proteínas para a conjugação e conseqüente degradação (Ciechanover e Schwartz, 1998). A degradação ocorre quando a proteína-alvo está associada à cadeia multi-ubiquitinada. Essa cadeia, então, será reconhecida por uma proteína receptora específica contida nos sistemas proteolíticos dependentes de ubiquitina. Após a degradação da proteína, a cadeia de poliubiquitina será removida e desmontada por uma enzima deubiquitinizante, a isopeptidase T (Lam et al., 2000), tornando as moléculas de ubiquitina livres e reutilizáveis (Ciechanover e Schwartz, 1998). A posterior ativação e conjugação da ubiquitina depende rigorosamente da exposição da região G76 exposta pelo processamento das enzimas deubiquitinizantes (Lam et al., 2000). Esta é, portanto, uma das etapas cruciais para a manutenção do funcionamento adequado do sistema ubiquitina por um complexo catalítico dependente de ubiquitina e ATP, conhecido como proteasoma 26S (Alves-Rodrigues et al., 1998).

O proteasoma 26S é um complexo proteolítico que degrada proteínas conjugadas à ubiquitina (Driscoll et al., 1992). A associação das funções do sistema ubiquitina às funções do complexo catalítico 26S, para a degradação de proteínas, constitui a via ubiquitina-proteasoma (figura 10).

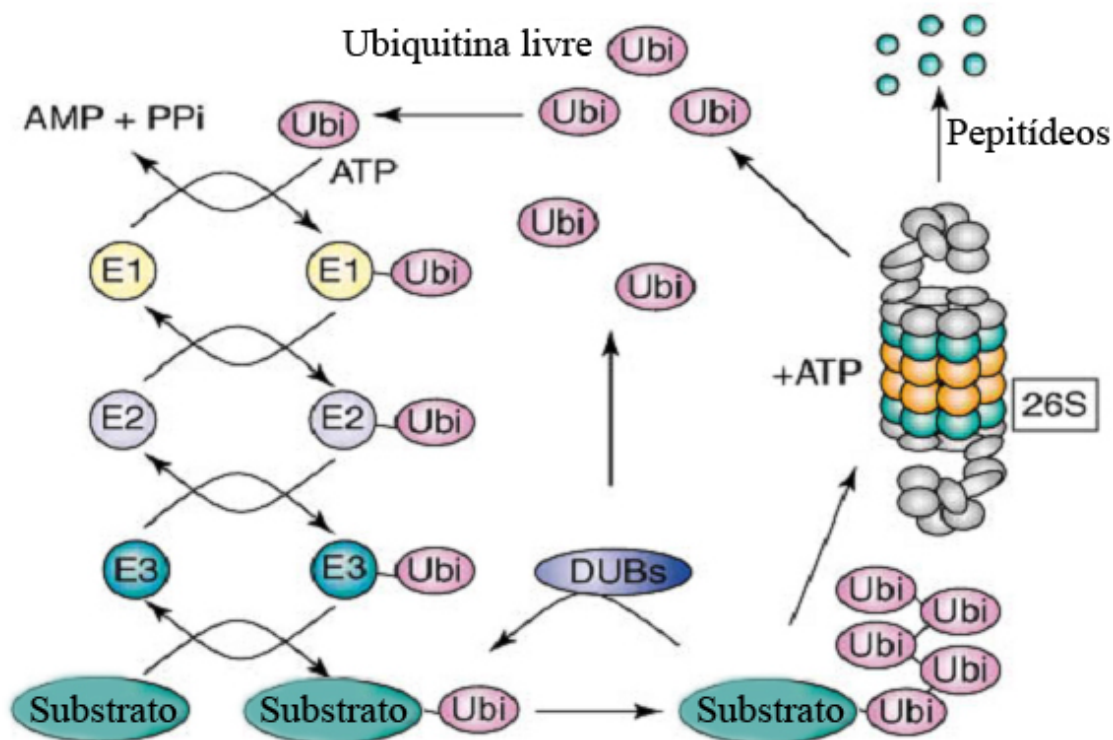


Figura 10. Desenho esquemático da via ubiquitina-proteasoma. Ubiquitinas livres (Ubi) são ativadas por enzimas E1, conjugadas por E2, ligadas aos substratos por enzimas E3 e levadas para o complexo proteasoma 26S para que os substratos sejam degradados. Após a degradação do substrato as cadeias de poliubiquitina são dissociadas por enzimas deubiquitinizantes (DUBs) e os peptídeos da proteína degradada retornam livres para o citoplasma. Reproduzido e adaptado a partir de Wójcik, 2001.

O controle da atividade do proteasoma é essencial para garantir a remoção de proteínas regulatórias de vida curta mas ao mesmo tempo prevenir a destruição de outros componentes celulares importantes. O sistema que distingue proteínas estáveis de proteínas que devem ser removidas é o sistema ubiquitina (Zwickl e Baumeister, 2002).

O Proteasoma 26S possui uma massa molecular de aproximadamente 2000 kDa. O centro catalítico do proteasoma 26S é o proteasoma 20S que é composto de 28 subunidades organizadas em 4 anéis heptaméricos empilhados para formar uma estrutura cilíndrica (Drexler, 1997; Alves-Rodrigues et al., 1998; Ciechanover e Schwartz, 1998; Ding e Keller, 2001), tendo, então, a seguinte constituição: α 1-7, β 1-7, β 1-7 e α 1-7. As diferentes subunidades α e β têm pesos moleculares que variam de 25 a 30 kDa (Ciechanover e Schwartz, 1998). O proteasoma 20S hidrolisa a maioria das ligações peptídicas presentes em uma proteína. Os sítios ativos residem nas subunidades β , dentro do canal central da partícula (Arendt e Hochstrasser, 1997). Interações específicas entre subunidades β heterólogas dentro de cada anel é também importante para a formação do sítio ativo. Os sítios proteolíticos clivam as ligações peptídicas nas regiões hidrofóbica, básica ou ácida da extremidade carboxi-terminal dos aminoácidos (Driscoll et al, 1992).

A parte reguladora do proteasoma 26S é conhecida como partícula 19S, que se dispõe nas extremidades do centro catalítico, sendo uma unidade 19S de cada lado (19S–20S–19S). O complexo 19S contém pelo menos 17 proteínas com pesos moleculares que variam de 25 a 110 kDa. Esse complexo não possui atividade catalítica e sim contribui para a atividade do proteasoma 20S (Ding e Keller, 2001), serve como porta de entrada para o centro catalítico e promove funções regulatórias diferentes que são necessárias para garantir a degradação seletiva de substratos-alvo da ubiquitina (Ciechanover e Schwartz, 1998). Um modelo em 3D do proteassoma 26S está apresentado na figura 11.

O proteasoma é gerado após a associação do complexo 20S com os dois complexos 19S, associação essa dependente de ATP (Ciechanover e Schwartz, 1998). Em todas as células o proteasoma 26S é primariamente citosólico, mas também é encontrado em associação com membranas microsomais ou localizado no núcleo. No citosol, o proteasoma é encontrado em associação com filamentos intermediários do citoesqueleto (Alves-Rodrigues et al., 1998).

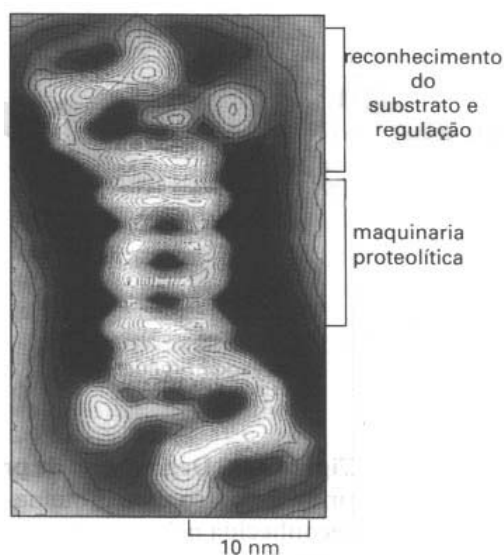


Figura 11. Um modelo em 3D de um único complexo completo do proteasoma 26S, derivado por processamento de imagem por computador. É possível observar os dois complexos 19S em ambas as extremidades e o centro catalítico 20S composto por 4 anéis. Reproduzido a partir de Alberts et al, 1993.

As proteínas erroneamente montadas podem interferir com funções celulares essenciais e devem ser eliminadas de forma rápida e eficiente, porém sob certas circunstâncias essas proteínas podem se aglomerar e acumular no citoplasma (figura 12). É possível assumir que essas proteínas podem se acumular em função de um mecanismo de defesa da própria célula, onde essas proteínas não-degradadas seriam depositadas em uma forma biologicamente inerte. Por outro lado, as proteínas agregadas podem também causar grandes danos celulares e agravar os efeitos deletérios de uma condição de estresse (Layfield et al., 2001).

As doenças neurodegenerativas podem estar, portanto, associadas à inabilidade do neurônio em degradar proteínas acumuladas. A falha na eliminação de depósitos de proteínas ubiquitinizadas pode resultar de um mau funcionamento da via ubiquitina ATP-dependente ou de alterações estruturais nas proteínas substratos, tornando-as inacessíveis à proteólise (Alves-Rodrigues et al., 1998). Portanto, alterações na via ubiquitina-proteasoma pode causar ou diretamente contribuir para a patogênese das doenças neurodegenerativas.

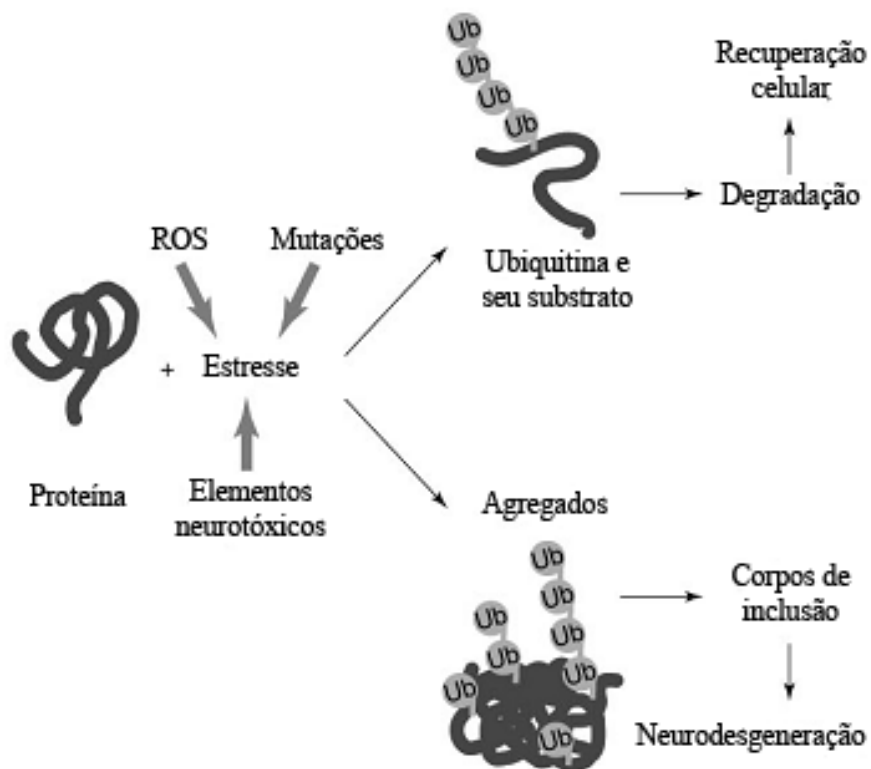


Figura 12. Desenho esquemático do destino das proteínas celulares sujeitas a fatores de estresse. Quando ubiquitinizadas, as proteínas são degradadas. As proteínas modificadas, ubiquitinizadas, não são degradadas, constituem corpos de inclusão, os quais alteram o funcionamento celular. Reproduzido e adaptado a partir de Alves-Rodrigues et al., 1998.

Morte Celular

A morte celular pode ocorrer por diferentes mecanismos, por exemplo por necrose ou apoptose. Necrose é um processo rápido onde ocorre edema na célula e destruição de sua membrana plasmática. Apoptose é um processo dependente de energia que pode ser iniciado por diferentes estímulos como, por exemplo, ausência de fatores neurotróficos, alteração dos níveis de glutamato com conseqüente influxo de cálcio e ativação de caspases (Pasinelli et al., 2000; Vukosavic et al., 2000).

Existem evidências que sugerem a participação de elementos pró-apoptóticos na ELA e conseqüentemente aumento da morte por apoptose, após a observação da alteração da expressão de Bcl-2 e Bax em neurônios motores de medula espinhal de ELA (Mu et al., 1996; Ekegren et al., 1999). Estudos também têm indicado que a enzima antioxidante SOD1 em indivíduos normais é anti-apoptótica, mas em sua forma alterada, como a encontrada em paciente portadores de ELA na sua forma familiar, é um fator pró-apoptótico (Pasinelli, 2000). A citocromo-c é uma proteína, presente no interior da mitocôndria, importante no processo de produção de ATP que pode ativar fatores pró-apoptóticos quando liberados pela mitocôndria (Friedlander, 2003). Alguns estudos demonstram que a redução gradual de citocromo-c no interior da mitocôndria está relacionada com a progressão da doença (Bacman et al., 2006). Além disso, tratamento com minociclina, que inibe a liberação de citocromo-c, diminui a progressão da doença em animais transgênicos utilizados como modelos da ELA (Kriz et al., 2003). Marcadores bioquímicos para apoptose podem ser detectados em estágios terminais de animais transgênicos e em portadores de ELA (Guegan et al., 2001).

I.1.2 – Farmacoterapia

A análise genética das doenças dos neurônios motores em humanos parece ter definido diversas vias moleculares para a conseqüente degeneração. A investigação do mutante SOD1 tem esclarecido um pouco mais o papel de componentes cruciais no processo da morte neuronal incluindo: uma propensão do mutante SOD1 de ser instável, uma multiplicidade de defeitos mitocondriais que causam depleção de energia, aumento da sensibilidade ao glutamato, ativação da maquinaria de morte celular programada e envolvimento de células não-neurais como moduladores da morte neuronal.

Porém, apesar disso, esse conhecimento ainda não é o suficiente para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que, pelo menos, impeçam a progressão da doença. Até o momento não há tratamento com impacto significativo. Aparentemente, vários fatores diferentes podem desencadear a morte dos neurônios motores como uma via final comum e, no momento, as estratégias terapêuticas dão ênfase a processos patobiológicos únicos. Esta abordagem monoterápica não tem sido sucesso.

Atualmente, a única medicação disponível para o tratamento da ELA é o agente anti-glutamatérgico riluzole (Rilutek[®]). Esta medicação melhora a sobrevida de alguns doentes, mas não de todos (Lacomblez et al., 1996) e mesmo nos pacientes que apresentam alguma melhora com essa medicação, a doença não deixa de progredir. A terapia antiglutamatérgica sozinha não traz grandes benefícios para os portadores de ELA.

O uso de fatores neurotróficos em pacientes portadores de ELA não demonstrou benefícios (Miller et al., 1996). Apesar disso, recentes estudos demonstraram que diminuição nos níveis do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), uma citocina com atividade

angiogênica e neuroprotetora, resulta em doença dos neurônios motores em camundongos (Oosthuysen et al., 2001) e que a administração deste fator em uma linhagem de camundongos (SOD1G93A) retarda o início e a progressão da doença (Azzouz et al., 2004).

O reconhecimento de que a ELA é uma desordem biológica e multicelular complexa levou a novos experimentos em modelos animais da doença. Kriz e colaboradores (2003) realizaram a administração de uma combinação de três drogas em animais transgênicos de ELA: riluzole (agente anti-glutamatérgico), verapamil (bloqueador de canais de cálcio) e minociclina, e demonstraram retardo no início da doença, lentificação na perda de força muscular e aumento da sobrevivência destes camundongos.

II.– OBJETIVOS

II.1– Objetivos Gerais

Este trabalho tem como objetivos estudar as alterações anatomopatológicas em medula espinhal de portadores de ELA esporádica, obtidos através de autópsia, e avaliar a presença de proteínas e de elementos-traço em líquido cefalorraquidiano e soro de pacientes portadores da doença.

II.2– Objetivos Específicos

1) Estudar através de técnicas de microscopia óptica de rotina os achados anatomopatológicos presentes na medula espinhal de casos de ELA;

2) Avaliar a presença, distribuição e localização das proteínas ubiquitina e proteasoma 26S em neurônios e astrócitos do corno anterior da medula espinhal, através de técnicas de imunohistoquímica em material de autópsia de casos de ELA e de pacientes-controle;

3) Realizar análise quantitativa das proteínas de proteasoma 26S, comparando os casos normais com os casos de ELA, em material de autópsia, após técnica de imunohistoquímica;

4) Analisar as possíveis diferenças existentes entre a expressão de proteínas no líquido cefalorraquidiano de casos normais e portadores de ELA, através de corrida eletroforética;

5) Avaliar a presença das proteínas de neurofilamentos e proteasoma 26S através da técnica de Western Blotting em líquido cefalorraquidiano de casos normais e em casos de ELA;

6) Analisar o perfil protéico do líquido cefalorraquidiano de pacientes portadores da doença, comparando-o com líquido cefalorraquidiano de pacientes normais, através de análise proteômica;

7) Avaliar o estresse oxidativo através da análise da expressão de proteínas contendo resíduos de nitrotirosina no líquido cefalorraquidiano e no soro de pacientes portadores de ELA e comparar com as amostras de pacientes controle;

8) Analisar elementos-traço presentes no líquido cefalorraquidiano e soro de pacientes com ELA através da técnica de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF) e comparar com as amostras de pacientes controle.

III. – MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. – Material

Foram obtidos, através de autópsia, segmentos de medula espinhal de três pacientes portadores de ELA (tabela 2) e de cinco pacientes cujo motivo de óbito excluem alterações neurológicas. O material de autópsia obtido de pacientes utilizados como controle foi proveniente de portadores de uma das seguintes condições patológicas: cardiopatia hipertensiva (n=1), aneurisma de aorta (n=1), infarto agudo do miocárdio (n=1) e insuficiência respiratória aguda (n=2). Além disso, foram obtidas amostras de líquido cefalorraquidiano e sangue de dez pacientes portadores de ELA (tabela 3) e de seis pacientes sem sinais de doença do neurônio motor. As amostras de líquido cefalorraquidiano e soro de portadores de ELA foram colhidas no mesmo dia. Os pacientes utilizados para controle, no caso do material de líquido cefalorraquidiano, apresentavam como diagnóstico ou sinais clínicos, cefaléia (n=4), amaurose súbita com recuperação parcial (n=1) e estenose de canal medular (n=1). Os pacientes utilizados para controle, no caso do material de sangue, não apresentavam quaisquer processos patológicos.

O material de autópsia utilizado nesta pesquisa foi obtido do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho. As amostras de líquido cefalorraquidiano e soro dos pacientes portadores de ELA foram obtidas no Instituto de Neurologia Deolindo Couto e amostras dos casos utilizados como controle foram obtidas no banco de líquido cefalorraquidiano do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho.

III.2 – Processamento do material de autópsia

O material de autópsia compreende segmentos de medula espinhal dos seguintes níveis medulares: cervical, torácico e lombar. Os segmentos foram fixados em formol a 4% e processados seguindo a técnica de rotina para inclusão em parafina.

Após emblocado, o material foi cortado no micrótomo em cortes de espessura entre 6-8 µm. Os cortes histológicos foram submetidos a técnicas histológicas de rotina e a técnicas imunohistoquímicas.

As lâminas contendo os cortes a serem observados foram levadas à estufa por 20 minutos, a 60°C, e posteriormente imersas em xilol a fim de desparafinizar os tecidos. As lâminas foram levadas a banhos em álcool em concentrações decrescentes, com objetivo de hidratar o tecido. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada. A partir desse momento, seguem-se os protocolos específicos para as finalidades desejadas.

Tabela 2

Caso	Sexo	Idade	Duração dos Sintomas	História Familiar	Características Clínicas
1	M	65	9 meses	Negativa	ELA
2	M	44	1 ano e 6 meses	Negativa	ELA
3	M	62	1 ano e 5 meses	Negativa	ELA

Casos de ELA (material de autópsia) utilizados

III.2.1 - Técnicas de coloração

Foram utilizadas as seguintes técnicas de coloração:

- ⇒ Hematoxilina-Eosina, técnica de coloração de rotina, utilizada com a finalidade de estudar a morfologia geral da estrutura.
- ⇒ Luxol Fast Blue, técnica de coloração especial, utilizada para observação mais detalhada das fibras mielínicas.

III.2.2 – Imunohistoquímica

Para a reação imunohistoquímica, utilizamos os seguintes anticorpos primários: anti-ubiquitina (Dako, diluição de 1:200), anti-proteasoma 26S (anti-subunidades α e β , Biomol, diluição de 1:2000), anti-GFAP (Novocastra, 1:100) e anti-neurofilamento pesado fosforilado (Sigma, 1:80). As reações imunohistoquímicas foram reveladas com o método da peroxidase.

Nesse protocolo, após a etapa de desparafinização e hidratação, prosseguiu-se da seguinte forma:

- As lâminas foram tratadas com peróxido de hidrogênio, diluído a 3% em água destilada, por 20 minutos, com objetivo de eliminar a peroxidase endógena do tecido.
- Em seguida, os cortes foram lavados três vezes em PBS triton a 3%, a 0,1M, pH 7,4 (tampão de uso) , por 5 minutos cada lavagem.

- Nesse momento, iniciou-se a etapa de bloqueio de sítios inespecíficos feito com soro normal de cabra a 10%, diluído no tampão de uso, por 1 hora.
- Após o bloqueio, as lâminas foram imersas em tampão citrato (pH 6,0) e levadas ao forno de microondas por 2 minutos, em potência 10, repetindo-se o procedimento por duas vezes, alternando com 5 minutos no freezer para resfriamento dos cortes. Esse procedimento é importante para a recuperação de sítios antigênicos.
- Seguiu-se a incubação com o anticorpo primário, até o dia seguinte (overnight).
- No dia seguinte, continuou-se o protocolo com três lavagens no tampão de uso, por 5 minutos cada lavagem.
- Seguiu-se, então, a incubação do anticorpo secundário biotilado, por 1 hora, com diluição recomendada e posteriormente foi aplicado o complexo avidina – biotina (Kit ABC, Vector), também por 1 hora, com uma lavagem entre as etapas.
- Após lavagem, foi feita a revelação das lâminas com 3,3`diaminobenzidina/H₂O₂ para anti-proteasoma e anti-neurofilamento, AEC para anti-ubiquitina e SG para anti-GFAP, por 5 a 7 minutos.
- As lâminas foram banhadas em PBS e colocadas na hematoxilina de Harris por 1 a 2 minutos.
- Após banho com água corrente, foi realizado o processo de fixação do material com três banhos de álcool em concentrações crescentes, chegando o último banho a 100%, com objetivo de desidratar o tecido.
- Seguiram-se mais três banhos de xilol, por 5 minutos cada.

- Por fim, as lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá, observadas ao microscópio óptico (Zeiss Axioskop 2 Plus) e fotografadas utilizando filme colorido com sensibilidade 400 ASA, ou as imagens foram adquiridas digitalmente.

III.2.3 – Análise Estatística dos Corpos Celulares Positivos Para Proteasoma

Foi analisada quantitativamente a intensidade de marcação presente nos corpos celulares neuronais, nos casos controle e de ELA, referente à marcação obtida com o anticorpo anti-proteasoma. A mensuração de imunorreatividade foi realizada visualmente. A marcação foi caracterizada como forte ou fraca e o número de corpos celulares no corno anterior dos segmentos medulares foram contados. Após a contagem, o número de células obtido, contendo marcação forte ou fraca, foi analisado estatisticamente pelo teste two-way ANOVA ($P < 0,05$ com o software Prism (GraphPad inc.).

Na análise foram observados ao microscópio óptico, de todos os casos de ELA e dos casos-controle, dois ou três segmentos de cada nível medular (cervical, torácico e lombar) e foram contados os neurônios do corno anterior a direita e a esquerda de todos os segmentos analisados.

III.3 – Colheita das amostras de líquido Cefalorraquidiano

A retirada do líquido cefalorraquidiano de pacientes portadores de ELA foi realizada após leitura e assinatura, pelo paciente ou responsável legal, do termo de consentimento livre e

esclarecido. O termo de consentimento livre e esclarecido pode ser encontrado em anexo (anexo 2). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Neurologia Deolindo Couto (anexo 3). As amostras utilizadas como controle foram obtidas do Laboratório de Líquido cefalorraquidiano do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho.

As punções foram efetuadas estando os doentes em decúbito lateral, direito ou esquerdo, indiferentemente. As coxas eram posicionadas em vigorosa flexão sobre o ventre e as pernas sobre as coxas. A cabeça era posicionada e mantida em flexão máxima sobre o tronco e a cabeça sobre o tórax, obtendo-se, assim, o aumento dos espaços intervertebrais.

As punções eram realizadas entre o quarto e o quinto espaço lombar, usando-se como ponto de reparo a linha horizontal que une as duas cristas ilíacas. O quinto espaço está localizado no meio desta linha. Era feita assepsia do ponto a puncionar, com tintura de iodo e álcool. Com o polegar era localizado exatamente o ponto a puncionar (depressão máxima entre as apófises espinhosas da quarta e quinta vértebras lombares). A agulha, com o mandril, era introduzida exatamente na linha média em posição rigorosamente horizontal e paralelamente à direção das apófises espinhosas. Ao perceber a resistência do ligamento espinhoso a agulha era introduzida mais lentamente, até o desaparecimento da resistência que indica a penetração da ponta da agulha no canal lombar. O mandril era retirado e era, então, observado o fluxo de líquido cefalorraquidiano. Em caso negativo, eram efetuados ligeiros movimentos da agulha no sentido ântero-posterior e observado novamente se havia fluxo de líquido cefalorraquidiano.

Todo o procedimento era realizado de maneira asséptica. O líquido cefalorraquidiano era colhido em tubo falcon estéril, armazenado em isopor com gelo e conduzido rapidamente para o laboratório. Pequenas frações de cada uma das amostras de líquido cefalorraquidiano adquiridas eram reservadas para dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976). O restante do

material era, então, armazenado em frações de 1ml em criotubos e levados para o freezer a -80°C graus.

III.3.1 – Pacientes de ELA e Grupo Controle

Foram obtidas 10 amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes portadores de ELA, forma esporádica, e 6 amostras de pacientes com outras alterações neurológicas, onde se excluí doenças do neurônio motor ou processos patológicos que conduzam a aumento de proteínas no líquido cefalorraquidiano (tabela 3).

O grupo de pacientes com ELA possuía idades variadas entre 30 e 67 anos. Em todos os casos o diagnóstico foi realizado pelos médicos especialistas em doenças do neurônio motor, do ambulatório de Doenças do Neurônio Motor do Instituto de Neurologia Deolindo Couto. O critério diagnóstico para todos os casos abrangeu:

- (1) Sinais de doença do neurônio motor superior e inferior em pelo menos duas das seguintes áreas: membros superiores, membros inferiores ou musculatura bulbar;
- (2) Ausência de anormalidades do sistema sensorial;
- (3) Eletroneuromiografia com evidências de desnervação ativa em pelo menos duas das seguintes áreas: membros superiores, membros inferiores ou musculatura bulbar;
- (4) Ausência de evidências de alterações estruturais em estudos de neuroimagem do encéfalo ou medula espinhal.

Tabela 3

Casos	Diagnóstico	Volume de proteínas em micrograma por microlitro	Idade	Sexo
1	Esclerose Lateral Amiotrófica	7,5	62	F
2	Esclerose Lateral Amiotrófica	1,1	49	M
3	Esclerose Lateral Amiotrófica	3,5	67	M
4	Esclerose Lateral Amiotrófica	2,7	30	M
5	Esclerose Lateral Amiotrófica	0,8	31	M
6	Esclerose Lateral Amiotrófica	2,1	55	M
7	Esclerose Lateral Amiotrófica	3,8	49	M
8	Esclerose Lateral Amiotrófica	2,0	34	M
9	Esclerose Lateral Amiotrófica	1,8	57	F
10	Esclerose Lateral Amiotrófica	1,0	51	M

Casos de ELA (LCR) utilizados

III.3.2 – Processamento do Líquido cefalorraquidiano para SDS-PAGE

As amostras de líquido cefalorraquidiano, durante processamento, eram descongeladas e tratadas com tampão de amostras (DTT; SDS; Tris 1 M pH6,8; Glicerol; Azul de Bromofenol e água destilada – relação de uma unidade de tampão de amostra para quatro unidades de amostra). Em seguida, este material era colocado em água fervente e mantido por cinco minutos. Após essa etapa, o material era colocado rapidamente em gelo e mantido assim até ser aplicado no sistema de corrida eletroforética em gel de poliacrilamida contendo lauril sulfato de sódio conforme originalmente descrito por Laemmli (1970).

O sistema e as soluções de eletroforese eram preparados. A porcentagem do gel era selecionada de acordo com o peso molecular das proteínas a serem observadas e, em seguida, as amostras eram aplicadas ao sistema de corrida. A corrida eletroforética era realizada por 1 hora e 30 minutos, a 100 Volts.

III.3.3 – Western-Blotting para Neurofilamentos e Proteasoma

Durante este processamento, foram utilizados os seguintes anticorpos primários: anti-neurofilamento leve (Sigma, 1:200), anti-neurofilamento médio (Sigma, 1:40), anti-neurofilamento pesado, forma fosforilada (Sigma, 1:40), e anti-proteasoma (Biomol, 1:200).

- Após a corrida eletroforética o gel era retirado e colocado no sistema de transferência em contato com membrana de PVDF. Antes, a membrana era tratada com metanol por 15 segundos, lavada com água destilada e mantida no tampão de transferência.

O sistema de transferência era montado da seguinte forma:

- Peça de acrílico, 1 esponja grossa, 3 folhas de papel filtro, o gel, a membrana, 3 folhas de papel filtro, 1 esponja grossa, 1 peça de acrílico, sempre mantendo tudo bem molhado no tampão de transferência.

- A cuba de transferência era coberta com o tampão de transferência gelado até em cima e colocada em um isopor com gelo.

- A transferência era realizada com 130 Volts por uma hora e trinta minutos.

- Após a transferência a membrana era retirada do sistema e corada com Vermelho de Ponceau para que fossem observadas as bandas de proteínas (confirmar que a transferência das

proteínas para a membrana foi realizada). A membrana era então, lavada com água destilada até clarear

- Para bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário, a membrana era incubada em PBS tween com leite desnatado a 10% por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação e, em seguida, lavada com PBS tween, 2 vezes por 15 minutos.

- A membrana era incubada com anticorpo primário diluído com PBS Tween, por 1 hora a 37°C.

- Em seguida, o anticorpo era retirado e a membrana era lavada com PBS Tween, 3 vezes por 15 minutos.

- Após era realizada incubação com o anticorpo secundário diluído em PBS Tween. Depois de uma hora e trinta minutos o anticorpo secundário era retirado e a membrana lavada com PBS Tween, 3 vezes por 15 minutos.

- O excesso de tampão era retirado da membrana e esta era incubada com ECL (Enhanced Chemiluminescence/ GE) por 1 minuto.

- No escuro (luz vermelha) um pedaço do filme era cortado e, então, feita uma exposição de no mínimo 1 minuto. O filme era revelado e fixado.

III.3.4 – Western-Blotting para Proteínas Contendo Resíduos de Nitrotirosina

- Após a corrida eletroforética o gel era retirado e colocado no sistema de transferência em contato com membrana de nitrocelulose.

- O sistema de transferência era montado da seguinte forma:

- Peça de acrílico, 1 esponja grossa, 3 folhas de papel filtro, o gel, a membrana, 3 folhas de papel filtro, 1 esponja grossa, 1 peça de acrílico, sempre mantendo tudo bem molhado no tampão de transferência.
- A cuba de transferência era coberta com o tampão de transferência gelado até em cima e colocada em um isopor com gelo.
- A transferência era realizada com 150 mA por duas horas.
- Para bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário, a membrana era incubada em PBS tween com caseína a 0,2%, por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação; e, em seguida, lavada com PBS tween, 2 vezes por 15 minutos.
- A membrana era incubada com anticorpo primário específico para 3-nitrotirosina (monoclonal, Upstate, EUA) diluído 250 ng/mL em PBS tween, por 1 hora, em temperatura ambiente.
- Em seguida, o anticorpo era retirado e a membrana era lavada com PBS tween, 3 vezes por 15 minutos.
- A incubação era então realizada com o anticorpo secundário (policlonal, conjugado com fosfatase alcalina, Bio Rad, EUA) diluído 1:3000 em PBS tween.
- Após uma hora e trinta minutos o anticorpo secundário era retirado e a membrana lavada com PBS tween, 3 vezes por 15 minutos.
- Após lavagens, as bandas imunoreativas eram reveladas por quimioluminescência.
- As imagens eram captadas mediante sistema Chemilmager (Alpha Innotech Corporation, EUA).

- As intensidades das bandas eram estimadas por análise densitométrica, empregando-se o software Alpha Ease FC versão 3.2.2 (Alpha Innotech Corporation, EUA).

III.3.5 – Processamento do Líquido cefalorraquidiano para Análise Proteômica

Purificação de Proteínas

Inicialmente foi determinada a concentração de proteínas totais de cada amostra pelo método de Bradford. Em seguida, foi adicionado às amostras tampão fosfato (0,02 M) e tampão NaCl (0,5 M). Depois, essas amostras foram adicionadas a uma coluna contendo cibacron blue (SIGMA), para retirada de albumina. O material foi colocado para permanecer sob agitação constante por 1 hora. Após, o material foi centrifugado e o sobrenadante retirado (as partículas do cibacrom ficam no fundo associadas à albumina da amostra). A concentração de proteínas totais deste sobrenadante foi novamente investigada.

Após o processo de purificação das proteínas as amostras foram submetidas à corrida eletroforética para confirmação da purificação.

As amostras dos casos utilizados como controle foram processadas juntas, como uma única amostra (*pool*), já que o volume e a concentração de proteínas foram insuficientes para eletroforese bidimensional. As amostras dos casos de ELA foram processadas e analisadas individualmente.

Eletroforese Bidimensional

Isoeletrofocalização (1D)

As proteínas das amostras (líquido cefalorraquidiano sem albumina) foram precipitadas com os kits (2D Quant kit e 2D Clean up – GE) e, em seguida, foram focalizadas em tiras de 11cm de Immobiline DryStrip pH4-7 (IPG) (Amersham Biosciences) tendo sido a primeira dimensão da eletroforese bidimensional realizada na unidade de Electroforese Multiphor II (Amersham Biosciences) por 30550vh seguindo o seguinte programa: 1 minuto a 300v e 0.001 vh, 6 horas a 300v e 2.9vh e 15.5 horas a 3500v e 19vh.

Foram utilizadas para a primeira dimensão tiras de Gradientes de pH 4 a 7 com 11 cm (GE). As amostras foram focalizadas nos sistemas Multiphor II e Ettan IPGphor II (GE).

Segunda Dimensão (2D)

Após a primeira dimensão as amostras foram equilibradas durante 30 minutos em tampão de equilíbrio, contendo ureia 6 M, glycerol 30%(w/v), SDS 2% em 0.05 M de Tris-HCl [pH8.8] e 0,01% de Azul de Bromophenol.

Nos primeiros 15 minutos as tiras foram equilibradas no tampão acrescido de 100 mg de DTT para cada 10mL. Nos 15 minutos restantes a solução foi trocada por mais 10 mL de tampão, contendo 250mg de iodoacetamina.

Após o equilíbrio das tiras a segunda dimensão era separada em géis prontos (ExcelGel SDS) em gradiente de 8–18% (Amersham Biosciences), utilizando padrões de peso molecular

pré-corados de ampla cobertura (Promega Broad Range). A visualização foi feita por coloração com Coomassie blue.

A coloração pela prata é uma das formas de detecção mais populares e sensíveis, com um limite de detecção entre 1 e 10ng. A utilização desta técnica representa uma vantagem em relação a outras colorações como, por exemplo, Coomassie blue, onde esse limite é de 50-100ng. Porém a escolha do Coomassie Blue foi relacionada à intenção de realizarmos posteriormente a identificação das proteínas por espectrometria de massas, já que a coloração pela prata dificulta esta análise.

Após a eletroforese, os géis foram fixados por 20 minutos em uma solução contendo 50% de metanol e 5% de ácido acético em água Milli Q. Após a fixação os géis foram lavados por mais 20 minutos com 50% de metanol. A fixação final foi feita em 5% de ácido acético e os géis ficaram armazenados a 4°C em 1% de ácido acético.

Análise dos Padrões Proteômicos

Após a eletroforese bidimensional os géis foram escaneados, analisados e comparados no software 2DElite Platinum (GE). As proteínas foram identificadas quanto ao seu ponto isoelétrico e peso molecular. Os géis foram normalizados, homogeneizados e comparados em pares e entre todos de um mesmo experimento, e entre experimentos diferentes. Após esta análise, foi determinado um gel como mapa de referência para cada condição estudada e depois as proteínas específicas de cada amostra foram retiradas para identificação por espectrometria de massas.

Os padrões individuais das amostras dos dez pacientes foram comparados entre si e com o *pool* de casos controle. A estratégia de agrupar as amostras dos casos controle foi essencial para que pudéssemos obter um padrão de expressão protéica de líquido cefalorraquidiano normal. O gel de amostras controle foi utilizado para comparação com todos os géis com amostras de portadores de ELA. As proteínas de cada amostra foram selecionadas e retiradas para análise.

III.3.6 – Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF)

Preparação das Amostras de Soro

A preparação das amostras consistiu apenas numa diluição da mesma, através da adição de 200 μL de água deionizada, sobre uma alíquota de 200 μL de amostra. A esta solução acrescentou-se 40 μL de uma solução padrão de gálio ($102,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Dessa solução, pipetam-se 8 μL no centro do suporte refletor, lucite, sendo secas à temperatura ambiente. Todas as amostras foram feitas em triplicatas.

Preparação das Amostras de Líquido cefalorraquidiano

Não houve diluição nesse tipo de amostra. O seu preparo consistiu apenas em adicionar 10 μL de gálio ($102,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), utilizado como padrão interno, em 100 μL de amostra. Dessa solução, pipeta-se 8 μL no centro do suporte refletor, lucite, sendo seca a temperatura ambiente. Todas as amostras foram feitas em triplicatas.

Instrumentação

As medidas foram realizadas na linha de Fluorescência de raios X (XRF) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas – São Paulo. As amostras de líquido cefalorraquidiano ou de soro foram posicionadas horizontalmente ao detector de germânio hiperpuro (HPGe) – resolução de 140 eV em 5,9 keV e excitada através de um feixe branco de irradiação de energia máxima igual a 20 keV, filtrado por 0,5 mm de alumínio com um ângulo de incidência de 1,0 mrad. O tempo de medida das amostras e dos padrões foi igual a 100s e os espectros de raios X característicos obtidos foram analisados através do software Sistema de Análise Quantitativa de Raios X (AXIL), distribuído pela Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), obtendo as intensidades dos raios X para cada elemento. Todas as medidas foram feitas em triplicatas.

Análise Estatística

Os dados obtidos da análise das intensidades dos Raio X para cada elemento foram analisados estatisticamente por um método baseado em análise multivariada, o General Linear Models (GLM).

IV. – RESULTADOS

IV.1. - Observações Gerais

A figura 13A ilustra o aspecto histológico normal de células do corno anterior da medula espinhal, onde se observam núcleos de astrócitos e uma significativa quantidade de neurônios. Os neurônios apresentam corpo celular grande, sendo possível observar, em sua maioria, alguns neuritos proximais. O núcleo, quando observado, é central e, algumas vezes, o nucléolo também é evidente. Nota-se a presença de substância de Nissl em grande quantidade e esta se encontra distribuída de forma regular por todo o pericário.

Nos casos de ELA há intensa perda neuronal nos cornos anteriores da medula espinhal comparado aos casos-controle, como observado nas figuras 13B a 13F. Essa perda neuronal está presente em todos os níveis medulares estudados. As regiões de perda neuronal são acompanhadas de extensa gliose, como observado nas figuras 13B a 13F. A gliose pode ser observada pelo aumento do número de núcleos de astrócitos quando comparado ao controle. Neurônios nos cornos laterais e posteriores apresentam-se morfológicamente normais (dados não mostrados). Esses achados são consistentes com o processo da doença que seletivamente afeta os neurônios motores. Nos casos de ELA, alguns dos neurônios remanescentes, nos cornos anteriores da medula espinhal, apresentam-se normais ou exibem alterações no pericário neuronal. Algumas destas alterações estão representadas por aumento do citoplasma e deslocamento do núcleo e organelas intracelulares para a periferia (fig 13B, 13G e 13H); essas alterações fazem com que alguns neurônios apresentem seus corpos celulares balonados (fig 13G). Além disso, foram identificadas inclusões intracitoplasmáticas eosinofílicas, como

observado na figura 13B. Estas inclusões são estruturas densas, com formato irregular ou arredondado. É possível observar também, nas figuras 13C e 13D, a presença de neurônios atróficos, caracterizados por diminuição acentuada do corpo celular e núcleo picnótico. Alguns neurônios motores apresentam pericário preenchido por vacúolos, como observado nas figuras 13E e 13F. Dilatações dos prolongamentos neuronais, que indicam um processo de degeneração axonal, chamados esferóides axonais foram observados nos cornos anteriores (dados não ilustrados). Os esferóides axonais são diferenciados dos corpos celulares neuronais, em cortes corados com HE, por apresentarem bordas de contorno irregular, ausência de substância de Nissl, e possuírem coloração mais pálida e homogênea. Essas alterações não foram encontradas nos casos-controle. Um resumo das alterações encontradas no corno anterior da medula espinhal dos casos de ELA encontra-se na tabela 4.

Tabela 4

Alterações	Local	Aparência ao microscópio óptico (HE)
Neurônios Atróficos	Corno anterior da substância cinzenta da medula espinhal	Células com núcleo picnótico e corpos atróficos
Neurônios balonados		Corpo celular arredondado e de grande tamanho
Esferóides Axonais		Estruturas arredondadas, com bordas crenadas e coloração pálida e homogênea
Gliose reacional		Citoplasma eosinófilo e evidente
Inclusões Intracitoplasmáticas	Pericário neuronal	Estruturas eosinófilas no citoplasma
Degeneração granulovacuolar		Vacúolos no citoplasma

Alterações morfológicas encontradas nos casos de ELA

Através da coloração de Luxol Fast Blue, técnica histológica que permite a visualização de mielina em azul, foi possível observar diminuição da mielinização dos axônios da região correspondente ao tracto córtico-espinhal (figura 13I).

IV.2. - Imunohistoquímica para GFAP

Nos casos utilizados como controle, a imunomarcção apresentou-se forte no citoplasma dos astrócitos, porém, observamos que estes se encontram em pequeno número. Os astrócitos dos casos-controle apresentam citoplasma e prolongamentos astrocitários bem definidos, como pode ser visto nas figuras 14A e 14B.

Nos casos de ELA observamos astrócitos com forte imunomarcção (figuras 14C e 14D). Os astrócitos dos casos de ELA apresentam maior número de prolongamentos. Estes prolongamentos encontram-se emaranhados, tornando impossível à identificação de apenas um astrócito.

IV.3. - Imunohistoquímica para Ubiquitina

Nos casos de ELA a imunorreatividade para ubiquitina apresenta-se intensa em áreas focais do pericário de neurônios de regiões do corno anterior da medula caracterizando inclusões intracitoplasmáticas (“skeins-like”), como pode ser observado nas figuras 15A-G. Essa imunomarcção também parece intensa no núcleo de alguns neurônios (figura 15C). Muitos astrócitos da substância cinzenta e da substância branca na região do tracto córtico-espinhal

apresentam núcleo e algumas vezes até o citoplasma, intensamente imunomarcados (figuras 15H-J). Grupos de neurônios em outras regiões, como no corno posterior ou lateral apresentam-se preservados e sem inclusões no pericário (dados não mostrados). Os casos-controle não apresentam acúmulos de proteínas nos corpos celulares neuronais e nem nos astrócitos (dados não mostrados).

IV.4. - Imunohistoquímica para Proteasoma (subunidades α e β)

Nos casos utilizados como controle a imunomarcção apresentou-se leve e homogênea, como pode ser observado nas figuras 16A e 16B. Na figura 16C observamos o controle negativo da reação contracorado com hematoxilina.

Nos casos de portadores de ELA os neurônios apresentam-se intensamente imunomarcados (Figuras 16D-F). Na figura 16D é possível observar a presença de um esferóide axonal. Esferóide axonal é uma dilatação do axônio localizada próximo ao corpo celular neuronal. É possível observar que o corpo celular do neurônio apresenta intensa imunorreatividade para as subunidades testadas, principalmente na região próxima ao cone de implantação do axônio, enquanto o esferóide axonal não exibe marcação, assim como todo o restante do axônio. Nas figuras 16E e 16F observam-se neurônios intensamente imunomarcados em áreas do corpo celular, caracterizando acúmulo das subunidades testadas. Também é possível observar na figura 16E neurônio atrofico fortemente marcado. Além disso, nos casos de ELA, alguns astrócitos da substância cinzenta expressam forte imunomarcção intracitoplasmática, como pode ser visto nas figuras 16G e 16H.

IV.5. – Análise Quantitativa

Avaliamos quantitativamente o número de corpos celulares neuronais que exibiram forte marcação para proteasoma α em β no corno anterior da medula espinhal, comparando os casos de ELA com os utilizados como controle. Essa análise evidenciou diferença significativa no número de corpos celulares neuronais exibindo aumento na expressão de proteasoma $\alpha\beta$ nos casos de ELA quando comparado aos controles. Esse aumento de expressão foi significativo em todos os segmentos medulares nos casos de ELA: cervical (figura 17A), torácico (figura 17B) e lombar (figura 17C).

IV.6. – SDS-PAGE

Após o rompimento da membrana plasmática do neurônio, as proteínas que se encontram aglomeradas no pericário neuronal são liberadas no espaço extracelular e é possível que essas proteínas alcancem a corrente líquórica. Em nosso estudo, avaliamos a expressão de proteínas em casos de ELA comparada aos casos-controle.

As proteínas presentes no líquido cefalorraquidiano em pessoas não portadoras de alterações neurológicas são: albumina, que corresponde à cerca de 56 a 76% do total de proteínas; pré-albumina e alfa₁ globulina, que correspondem a 2-7% cada uma; alfa₂ globulina, correspondente a 4-12%, beta globulina, correspondente a 8-18% e gamaglobulina, correspondente a 3-12% do total de proteínas.

A análise do líquido cefalorraquidiano, a partir do SDS-PAGE, revela diferenças entre as amostras dos casos utilizados na corrida eletroforética com relação à expressão de proteínas.

Nessa análise foram observadas diferenças na quantidade de proteínas entre as amostras (figura 18A). Na figura 18A é possível observar amostras de caso-controle, casos de ELA, extrato total de encéfalo de rato e os marcadores de peso molecular, corados com azul de comassie. A partir dessa análise inicial, a quantidade de proteína em cada uma das amostras foi dosada pelo método de Bradford (1976) e, posteriormente, foi realizada uma nova corrida eletroforética para que todas as amostras apresentassem quantidades similares de proteína (figura 18B). A proteína que é expressa em maior quantidade é a albumina, tanto nos casos-controle como nos casos de ELA. Esta proteína possui um peso molecular de aproximadamente 67 kDa.

IV.7. – Western Blotting para Neurofilamentos e Proteasoma 20S

Realizamos Western Blotting em amostras de líquido cefalorraquidiano de 6 casos normais e dez casos de portadores de ELA, utilizando anticorpo anti-neurofilamento pesado, forma fosforilada, anticorpo anti-neurofilamento médio, anticorpo anti-neurofilamento leve e anti-subunidades α e β do proteasoma 20S.

Nos casos dos pacientes controle não houve imunomarcção para o anticorpo anti-neurofilamento pesado (figura 19A), porém o extrato total de encéfalo de rato utilizado como controle positivo para o experimento (figura 19B) apresentou imunorreatividade para o anticorpo. Nos casos de portadores de ELA o anticorpo reconheceu a proteína em sete das dez amostras de líquido cefalorraquidiano avaliadas (figura 19C).

Não houve imunomarcção para as subunidades média e leve das proteínas de neurofilamentos, nem nos casos controle nem nos casos de ELA. Em ambos os experimentos o

extrato total de encéfalo de rato exibiu marcação positiva para as subunidades testadas (dados não mostrados).

O Western Blotting realizado para detectar a presença das subunidades α e β do proteasoma 20S foi negativo nos casos controle e no caso de portadores de ELA, mas positivo no extrato total de encéfalo de rato (figura 20).

IV.8. – Western Blotting para Proteínas com Resíduos de Nitrotirosina

Embora os eventos relacionados à morte de neurônios motores na ELA ainda não estejam completamente elucidados, tem sido proposto que o estresse oxidativo desempenhe um papel importante no processo neurodegenerativo (Rowland, 1998). Essa hipótese surgiu da identificação de propriedades tóxicas da enzima SOD1 mutante em casos de ELA familiar. Segundo Pasinelli e Brown (2006), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou o peroxinitrito ($ONOO^-$) podem reagir com SOD1 e catalisar a nitração de de tirosina, gerando nitrotirosina.

Para avaliar a presença de sinais resíduos indicativos de estresse oxidativo no líquido cefalorraquidiano e no sangue dos portadores de ELA, nós investigamos os níveis de resíduos de nitrotirosina das amostras de pacientes portadores da doença e de casos-controle através da técnica de Western Blotting. A análise comparativa não evidenciou diferença significativa na expressão de resíduos de nitrotirosina entre os grupos, como pode ser observado nas figuras 21A e B. Diferentes proteínas apresentam-se nitradas, porém estas proteínas estão presentes em todos os casos de portadores de ELA e nos casos utilizados como controle.

IV.9. – Análise Proteômica

Realizamos análise proteômica de amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes portadores de ELA e de casos-controle, com o objetivo de avaliar possíveis diferenças no padrão de expressão de proteínas em ambos os grupos. Na figura 22A é possível observar um fluxograma evidenciando todas as etapas realizadas, até o momento, para análise proteômica dessas amostras. O primeiro passo para esta análise foi a purificação das amostras de líquido cefalorraquidiano. Dentre as proteínas presentes no líquido cefalorraquidiano de casos normais, a albumina é expressa em grande quantidade (figura 22B) e sua presença dificulta a identificação de proteínas expressas em menor quantidade, como por exemplo proteínas anormais provenientes de condições patológicas.

Purificação das amostras

As amostras foram submetidas à análise de concentração de proteínas e posteriormente tratadas para retirada do excesso de albumina. Na figura 22B podemos observar, em uma corrida eletroforética, a expressão de albumina em uma amostra antes da purificação, e na figura 22C a expressão de albumina da mesma amostra após o processo.

Eletroforese Bidimensional

Após precipitação de proteínas das amostras purificadas, foi realizada a focalização isoeétrica do material tratado (primeira dimensão) e, em seguida, foi realizada a eletroforese de segunda dimensão. Desta maneira, as proteínas de cada amostra eram separadas pelo seu ponto isoeétrico e, posteriormente, pelo seu peso molecular. Após a corrida eletroforética de segunda dimensão os géis foram corados com Coomassie Blue e foi observado o padrão de expressão proteômica das amostras.

Observamos o número de proteínas em cada gel, além da faixa de peso molecular e pH em que essas proteínas se distribuíram. Os resultados preliminares obtidos com esta metodologia contribuíram para a visualização de um padrão bidimensional preliminar de amostras de líquido cefalorraquidiano de casos controle e pacientes portadores de ELA (figuras 22D e 22E).

Análise dos Padrões Proteômicos

O padrão protéico obtido com a focalização das amostras dos cinco casos-controle (figura 22D) apresentou *spots* distribuídos ao longo de um gradiente de pH 4-7 e um peso molecular distribuído entre 7 e 209 kDa. A maioria das proteínas estavam concentradas entre 7 e 80 kDa. O mesmo ocorreu com o padrão protéico das amostras dos casos de ELA, porém um número maior de proteínas foi observado em todos os casos de ELA analisados (figura 22E e 22F). Todos os casos estudados tiveram suas proteínas retiradas dos géis e armazenadas para futura análise por espectrometria de massa. Até o momento, apenas as proteínas do *pool* de casos controle e três dos

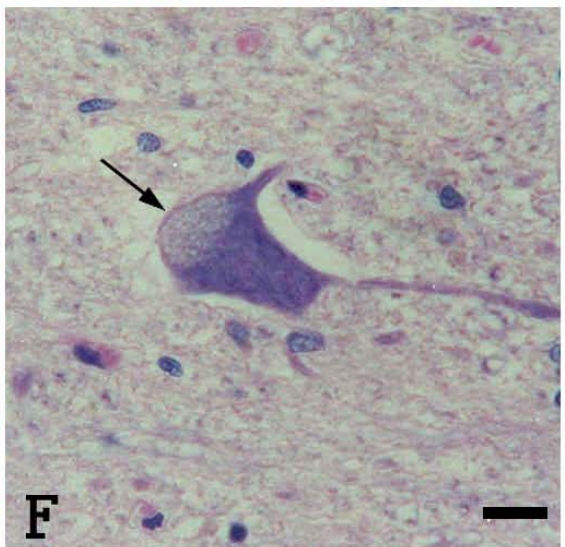
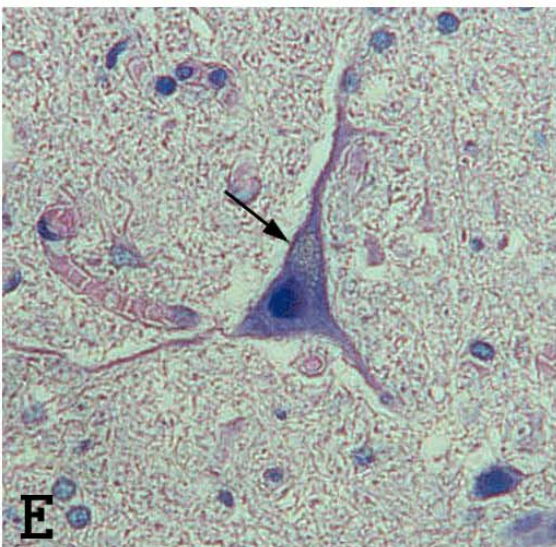
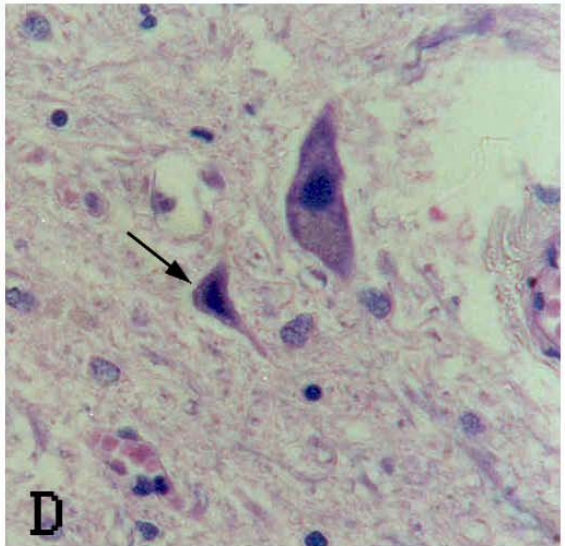
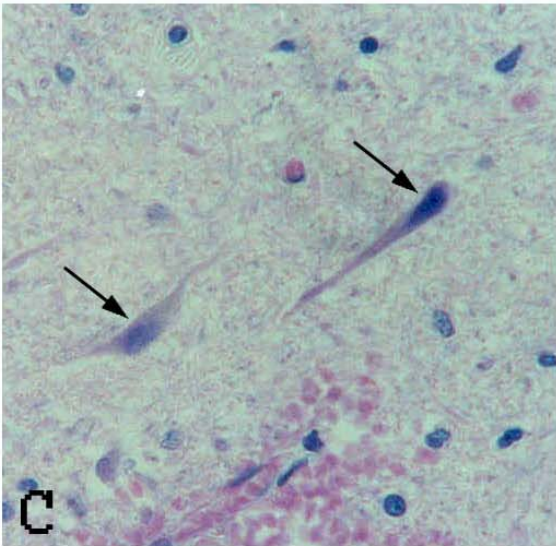
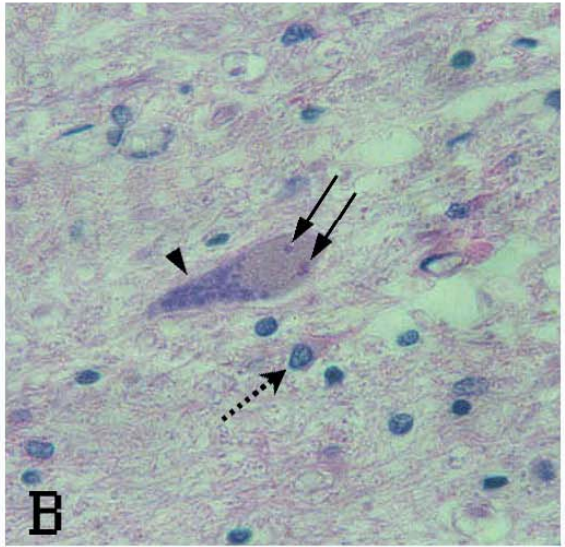
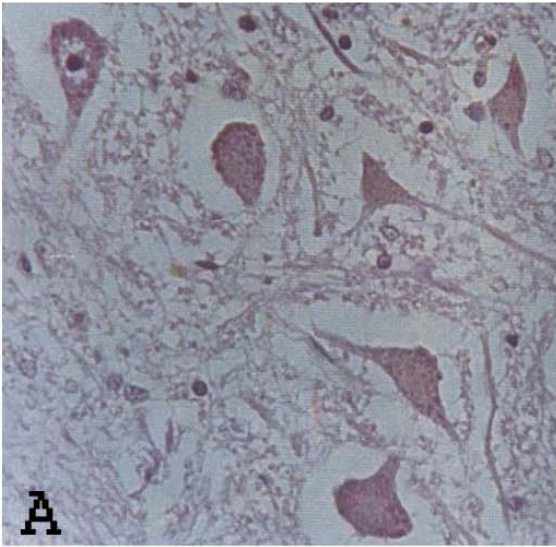
dez casos de ELA foram identificadas pelo MALDI-TOF (figuras 22G-K). Nas figuras 22G-I observamos as proteínas identificadas nos casos controle e em três casos de ELA. Na figura J observamos as proteínas expressas nos três casos de ELA analisados e não expressas no *pool* de casos controle e na figura K é possível observarmos as únicas proteínas expressas somente em dois dos três casos de ELA analisados e não expressas no *pool* de casos controle.

IV. 10. – Fluorescência de Raios X por Reflexão Total

O conhecimento da distribuição espacial de elementos traço em tecidos e da concentração desses elementos em fluidos biológicos é de grande importância, já que estes elementos estão envolvidos em várias funções biológicas (Bohic et al., 2001). Em nosso trabalho investigamos as concentrações de vários elementos no líquido cefalorraquidiano e no soro de casos controle e em casos de ELA, com a intenção de observar as possíveis variações dos elementos investigados nesta condição patológica. Realizamos esta análise utilizando a fluorescência de raio-X por reflexão total com radiação síncroton. Os seguintes quatorze elementos foram analisados: alumínio, bromo, cálcio, cloro, cobre, cromo, enxofre, ferro, fósforo, níquel, potássio, rubídio, silício e zinco. Após análise estatística evidenciamos diferença significativa referente às concentrações de cálcio, cloro e potássio presentes no líquido cefalorraquidiano de portadores de ELA quando comparado aos casos utilizados como controle (figura 23). Esses elementos apresentaram-se mais concentrados no líquido cefalorraquidiano de portadores da doença. Os outros elementos não apresentaram diferenças significativas em suas concentrações no líquido cefalorraquidiano em ambos os grupos. A análise estatística dos elementos-traço no soro não evidenciou diferença entre os grupos para nenhum dos elementos analisados. Apesar de não

observarmos diferenças significativas estatisticamente para a maior parte dos elementos, pudemos observar variações entre os grupos para alguns elementos. Por exemplo, o alumínio e o ferro parecem estar menos concentrados tanto no líquido cefalorraquidiano quanto no soro de portadores de ELA quando comparado aos casos-controle (figura 24A,B). Já o cobre parece estar aumentado no soro dos portadores da doença (figura 24C).

Figura 13. Fotomicrografias de medula espinhal coradas com Hematoxilina-Eosina (A-H) e Luxol Fast Blue (I). (A) Controle. (B-I) Casos de ELA. (A) Ilustração de neurônios motores normais presentes no corno anterior da medula espinhal. (B) Neurônios com a presença de inclusões citoplasmáticas eosinofílicas (setas) e substância de Nissl deslocada para o lado oposto (cabeça de seta), além de gliose reacional (seta pontilhada). (C e D) Neurônios atrofícos, apresentando corpos celulares diminuídos e núcleos picnóticos (setas). (E e F) Neurônios apresentando vacúolos no citoplasma (setas). (G) Neurônio balonado com núcleo e substância de Nissl deslocada para a periferia do corpo celular (seta), nota-se também astrócitos reacionais (cabeças de seta). (H) Neurônio com núcleo e substância de Nissl deslocada para a extremidade (seta). (I) Palidez da região correspondente ao tracto córtico-espinhal em caso de ELA. Barra de calibração: (A-H) 23 μ m e (I) 57 μ m.



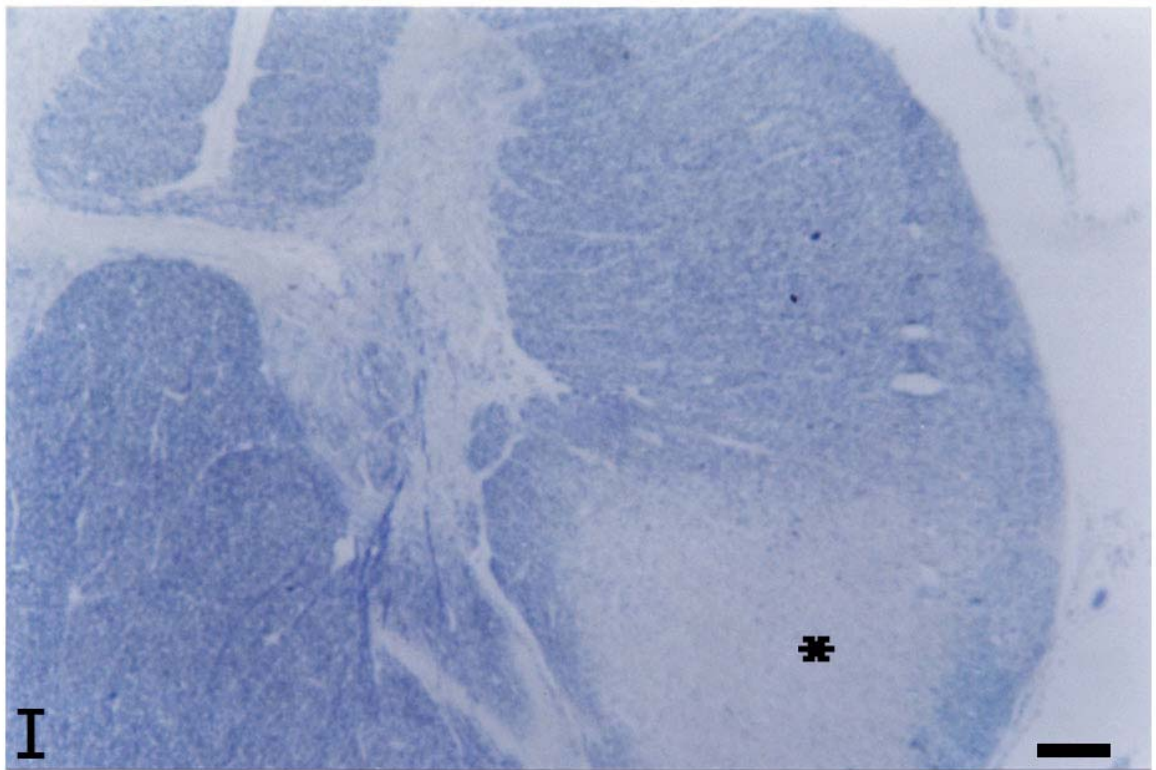
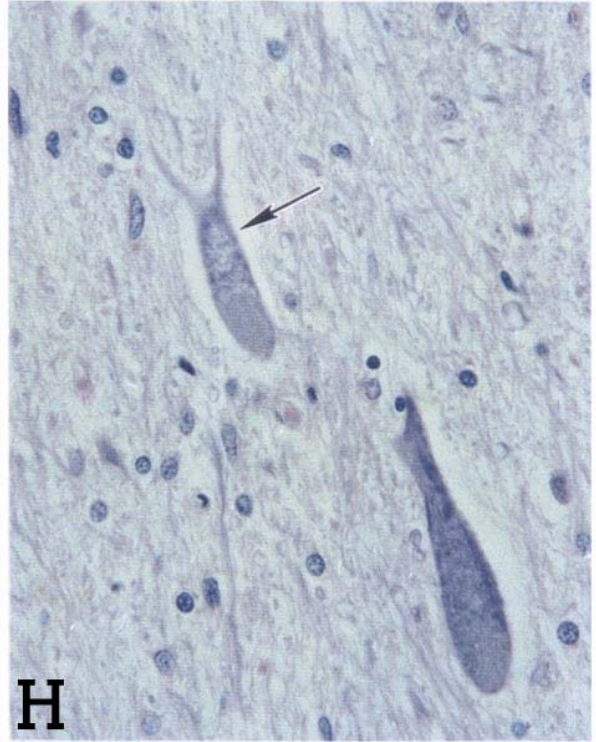
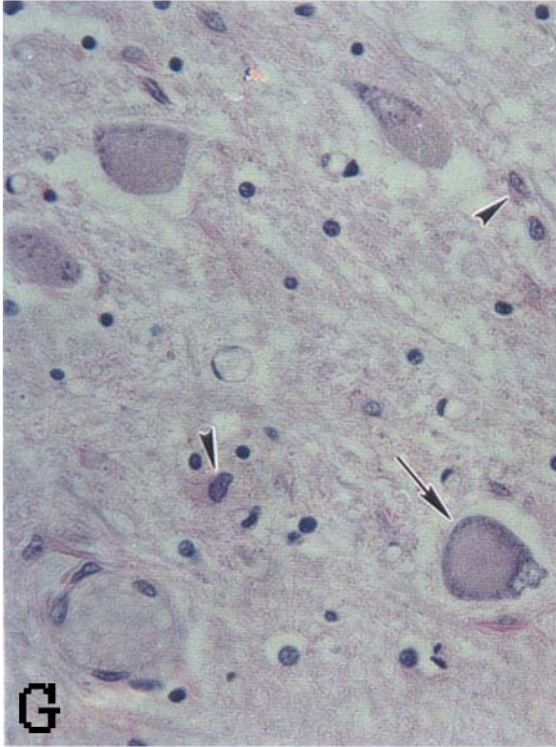


Figura 14. Imunohistoquímica para GFAP (A-D). (A e B) Controle positivo. Astrócitos exibindo intensa imunomarcção no citoplasma (setas). Notar os prolongamentos bem definidos. (C e D) Aumento da quantidade de prolongamentos GFAP positivos em casos de ELA. Barra de calibração: (A e C) 47 μ m e (B e D) 10 μ m.

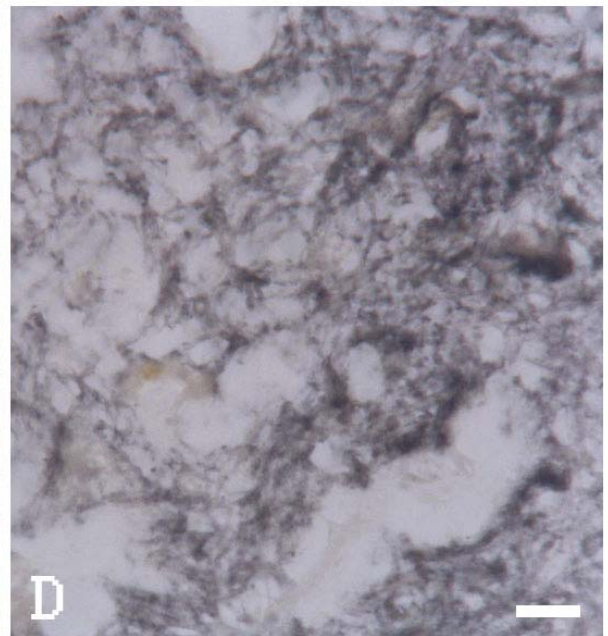
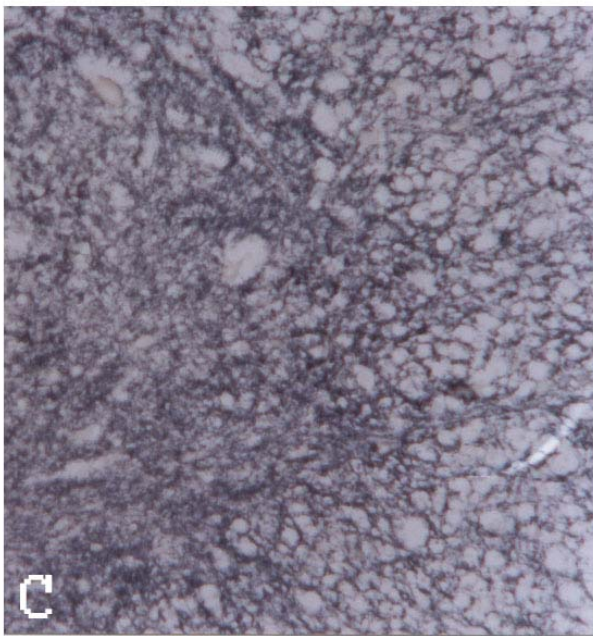
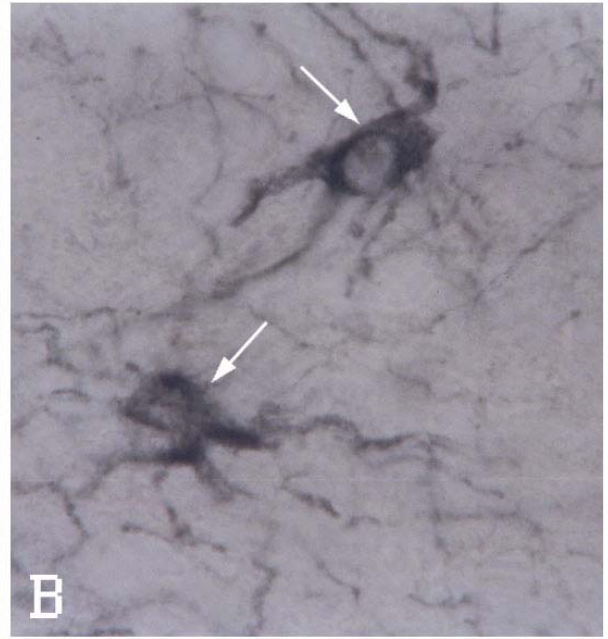
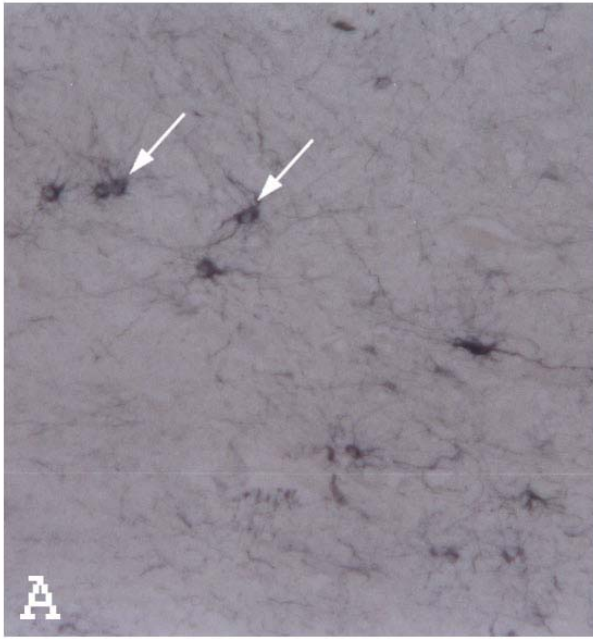
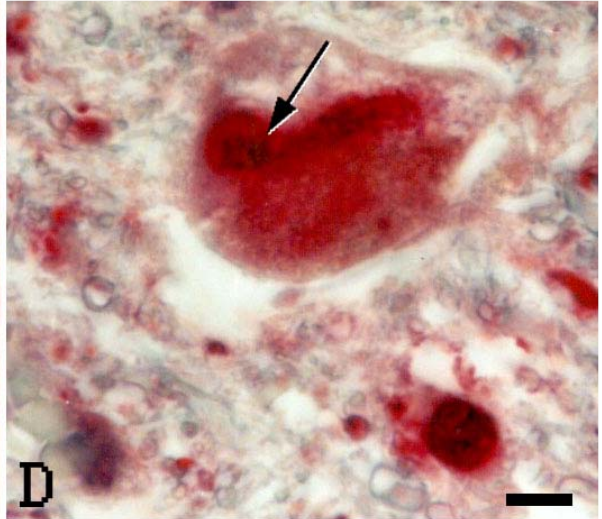
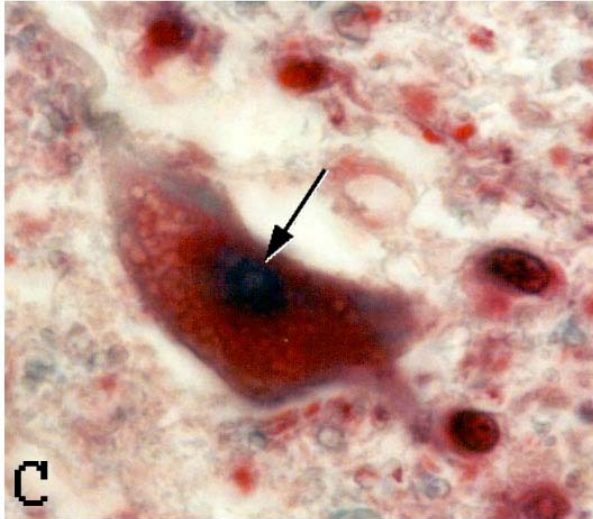
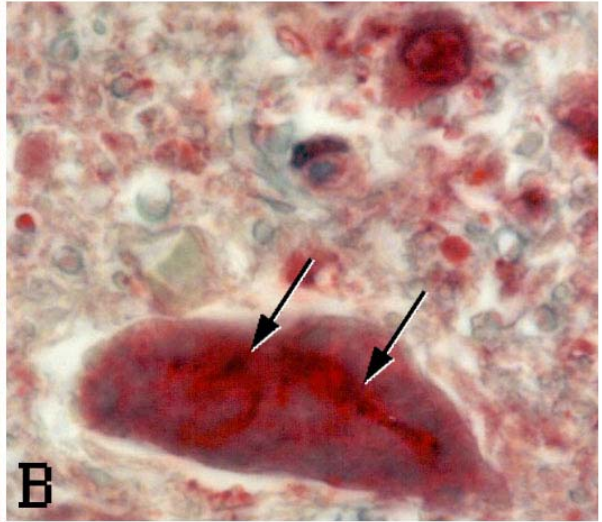
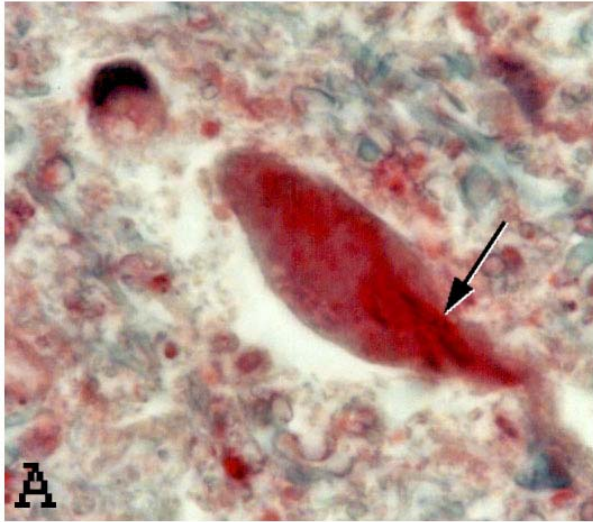


Figura 15. Imunohistoquímica para Ubiquitina (A-J). (A, B, D, E, F e G) Neurônios de casos de ELA exibindo intensa imunomarcção em regiões focais do pericário neuronal, caracterizando as inclusões intracitoplasmáticas (setas). (C) Forte imunomarcção em núcleo de neurônio (seta) de caso de ELA. (H-J) Intensa imunomarcção no núcleo e citoplasma de astrócitos de casos de ELA. (H) Astrócito imunomarcado localizado na região do tracto córtico-espinhal da substância branca de casos de ELA (seta). (I-J) Astrócitos de casos de ELA localizados na substância cinzenta do corno anterior da medula positivos para ubiquitina (setas). Barra de calibração: 23µm



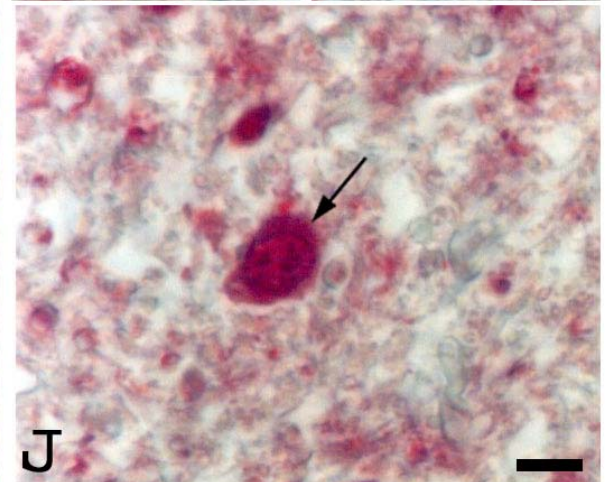
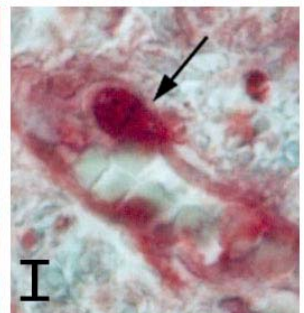
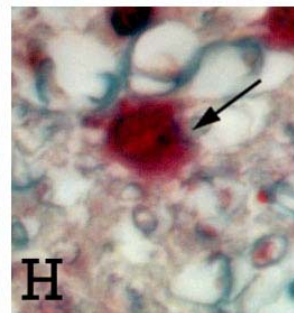
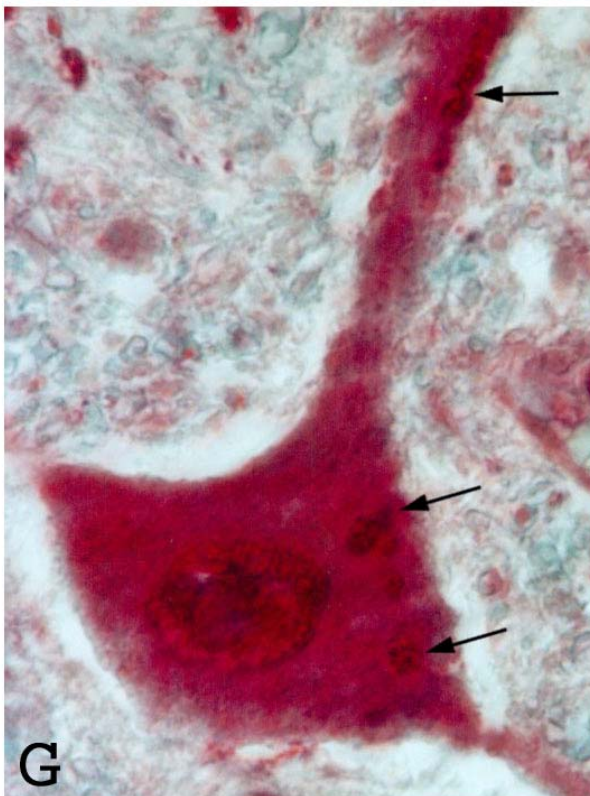
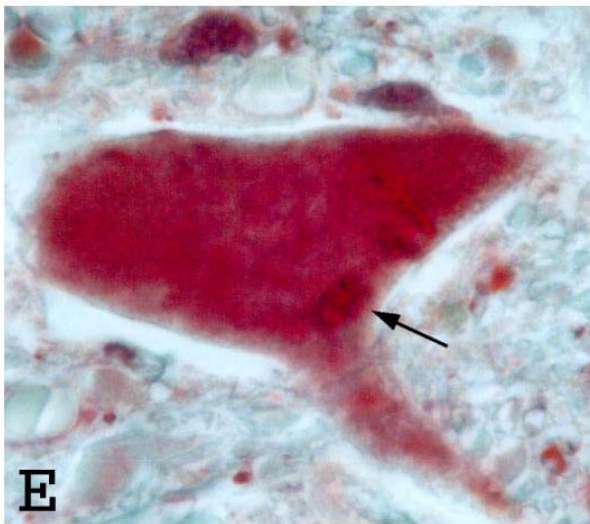


Figura 16. Imunohistoquímica para Proteasoma (A-H). (A e B) Controle positivo. (C) Controle negativo. (D-F) Neurônios exibindo intensa imunomarcção em regiões focais do pericário neuronal (setas). (D) Neurônio com forte imunomarcção no pericário (seta) e intensa imunomarcção em região de cone de implantação do axônio (seta pontilhada). Esferóide axonal (cabeça de seta). (G e H) Forte imunomarcção em citoplasma de astrócitos da substância cinzenta do corno anterior da medula (setas). Barra de calibração: 23 μ m

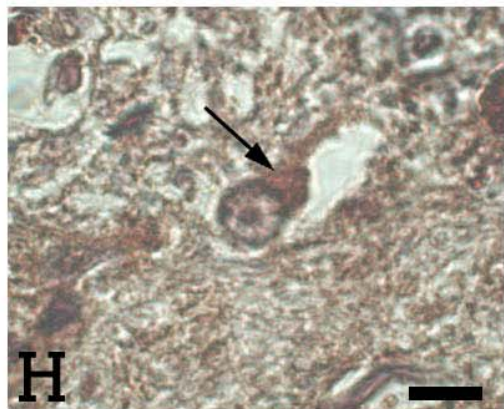
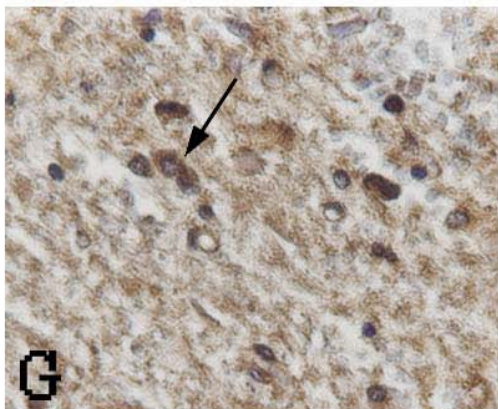
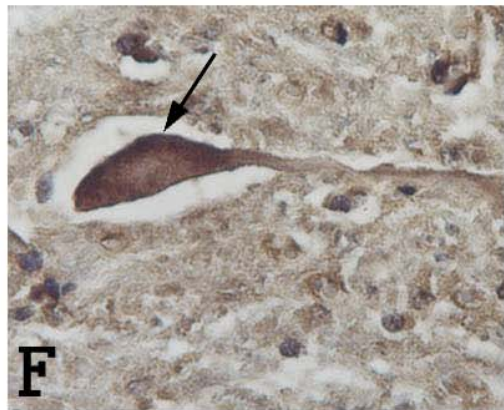
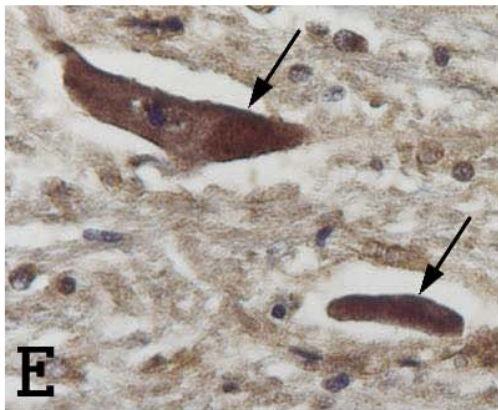
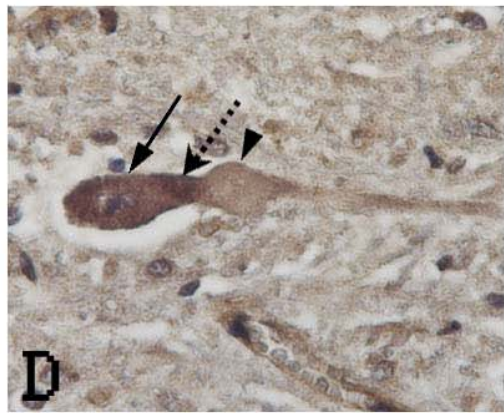
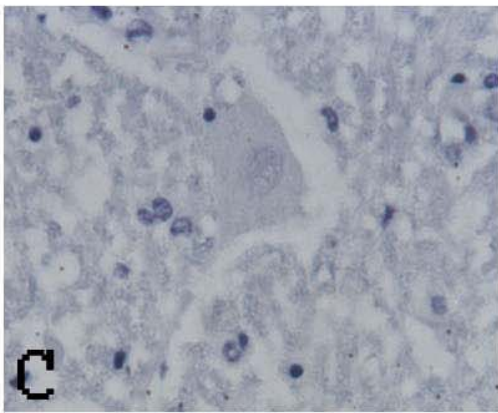
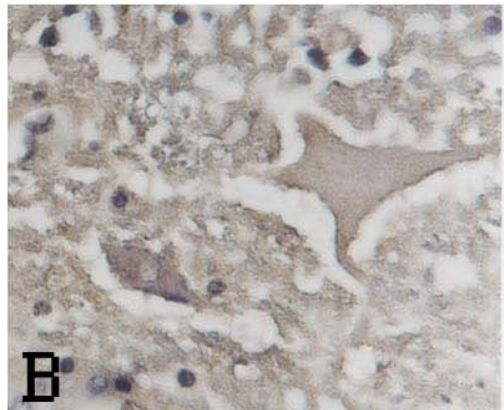
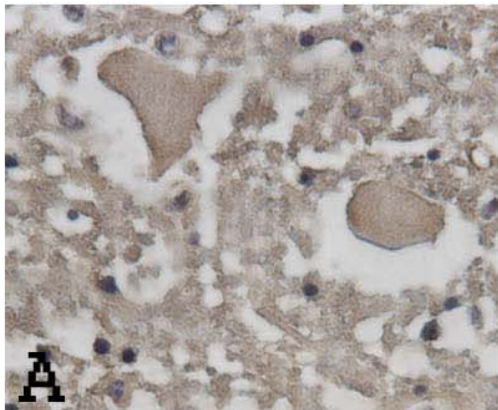


Figura 17. Análise quantitativa da expressão de Proteasoma 20S (A-C). Porcentagem significativa de neurônios fortemente marcados nos segmentos cervicais (A), torácicos (B) e lombares (C) nos casos de ELA comparado aos casos controle (* $p < 0,05$).

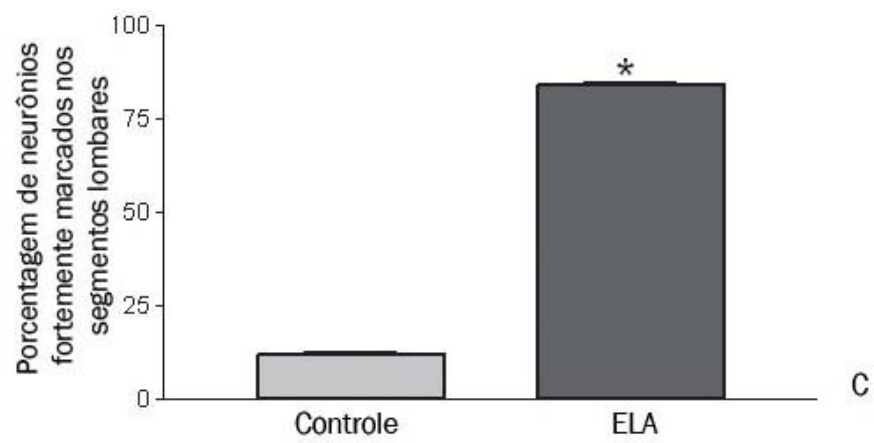
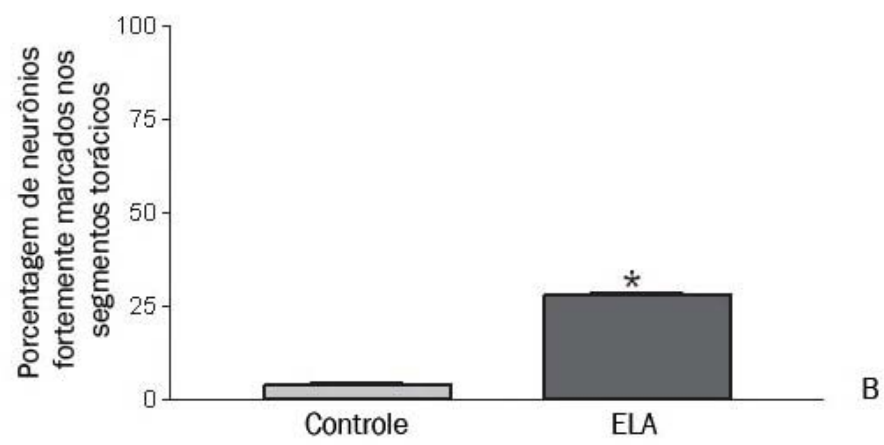
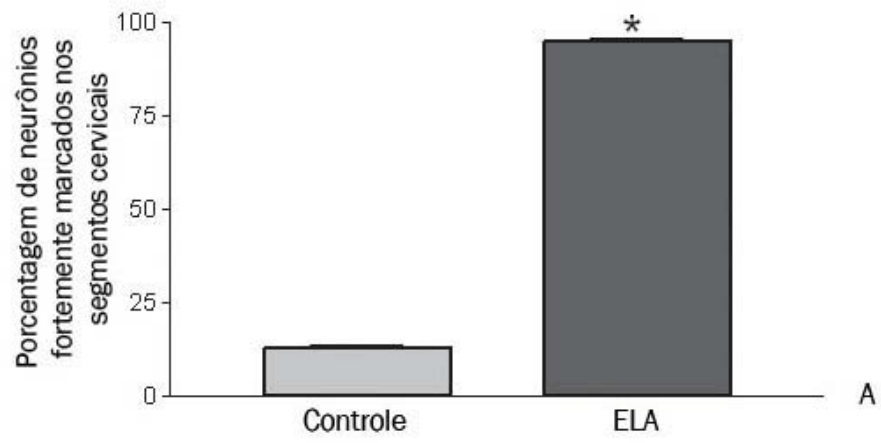


Figura 18. SDS-PAGE. (A) Amostras de extrato total de encéfalo de rato, marcadores de peso molecular, amostras de controle e ELA, coradas com azul de Coomassie. (B) Amostras de casos-controle e de ELA após dosagem de proteína pelo método de Bradford, coradas com azul de Coomassie.

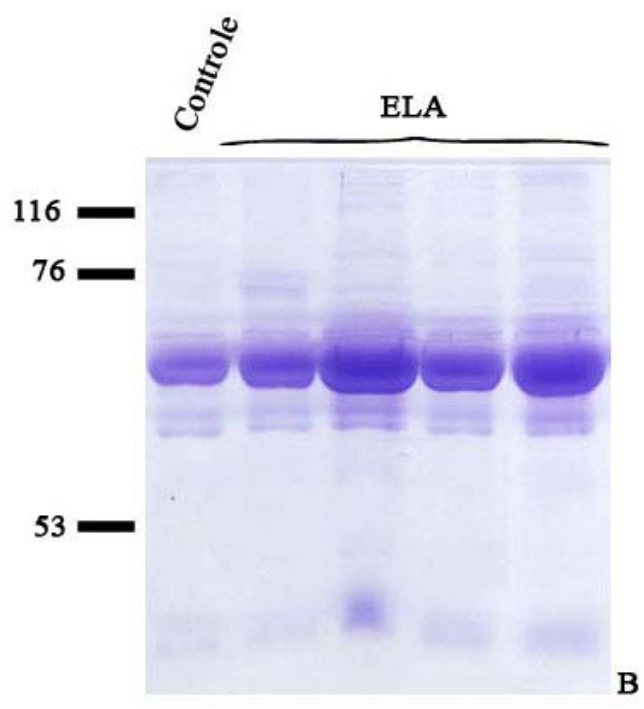
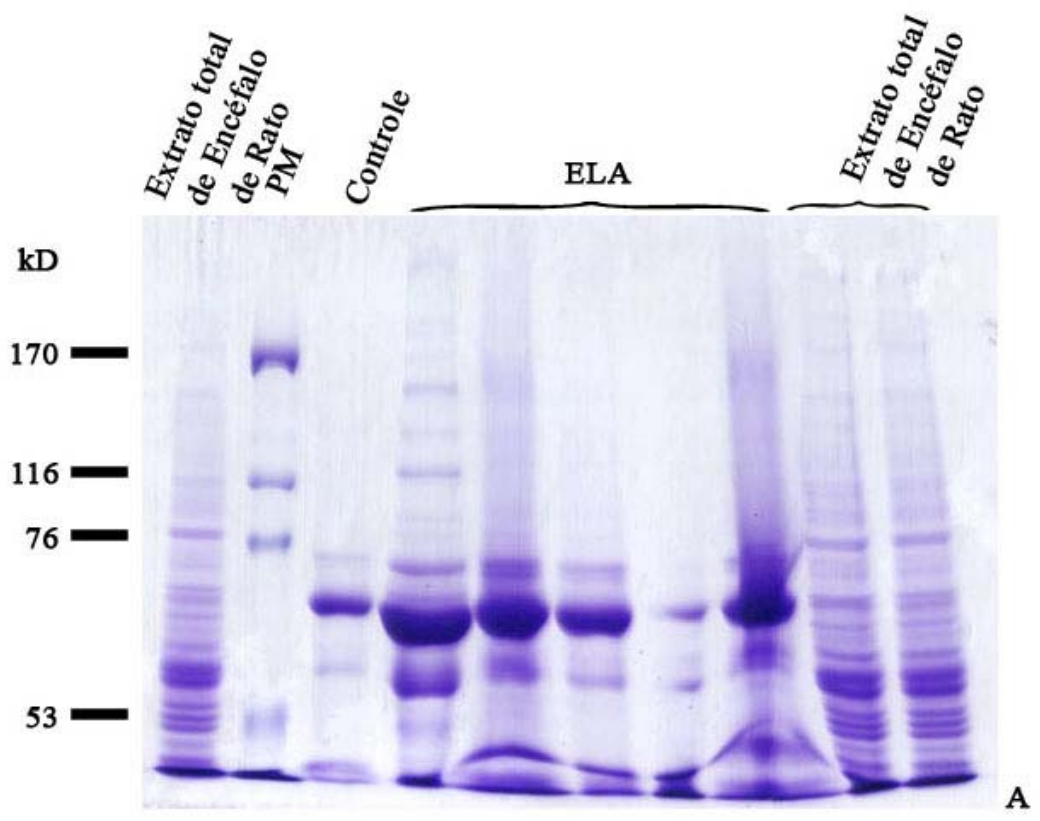


Figura 19. Western Blotting para Neurofilamento Pesado (NF-H) (A-C) (A) Imunoblotting para a proteína de neurofilamento (subunidade pesada, forma fosforilada), em três amostras de caso controle, evidenciando ausência de imunomarcção para a subunidade testada. (B) Extrato total de encéfalo de rato marcado positivamente com o anticorpo. (C) Sete das dez amostras de ELA exibiram marcação positiva para neurofilamento pesado na sua forma fosforilada.

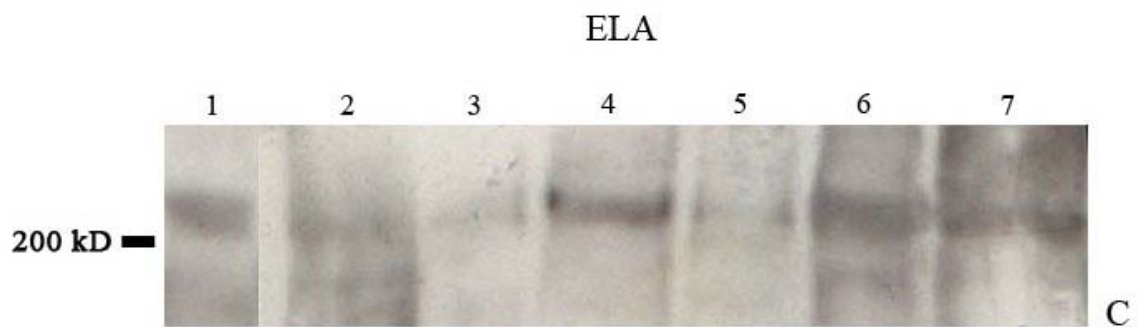
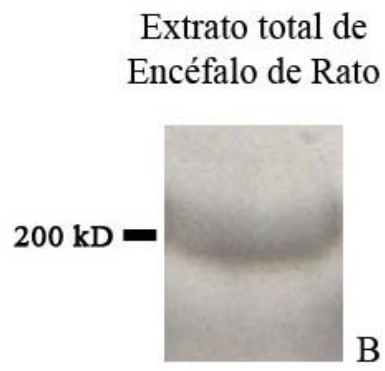
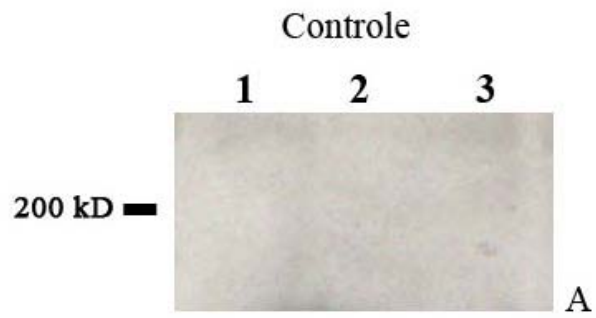


Figura 20. Western Blotting para Proteasoma (A-C) (A,C) Imunoblotting para proteasoma em amostras de casos controle (n=5) e casos de ELA (n=10) evidenciando ausência de imunomarcção para a subunidade testada. (B) Extrato total de encéfalo de rato marcado positivamente com o anticorpo.

Casos Controle



A

Extrato Total de
Encéfalo de Rato



B

Casos de ELA



C

Figura 21. Western Blotting para resíduos de Nitrotirosina (A,B) (A) Imunoblotting para nitrotirosina em amostras de líquido cefalorraquidiano de casos controle (n=5) e casos de ELA (n=10) não evidenciando diferenças entre ambos os grupos. (B) Imunoblotting para nitrotirosina em amostras de soro de casos controle e casos de ELA não evidenciando diferenças entre ambos os grupos.

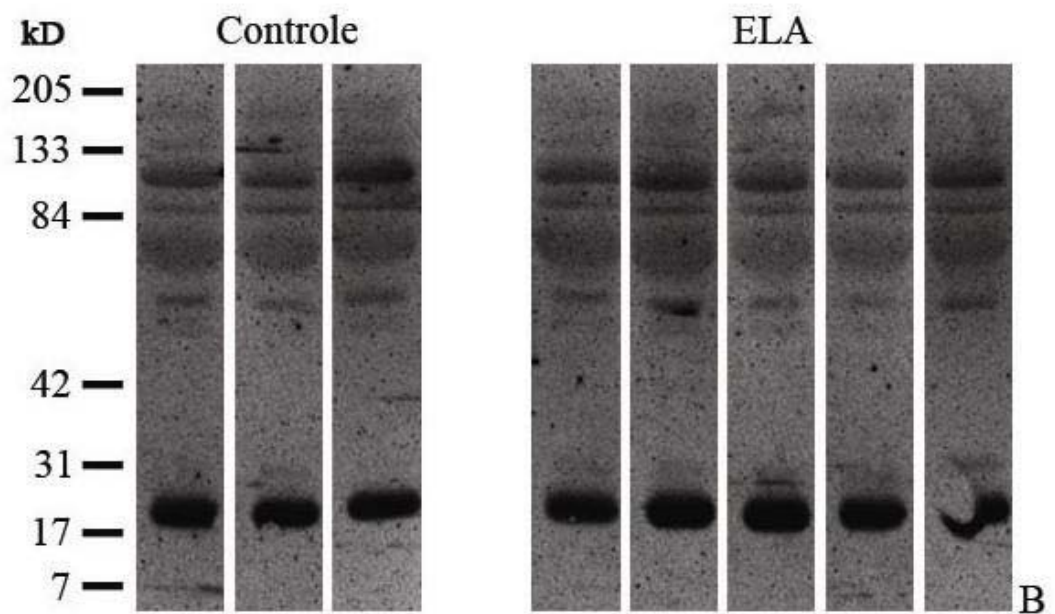
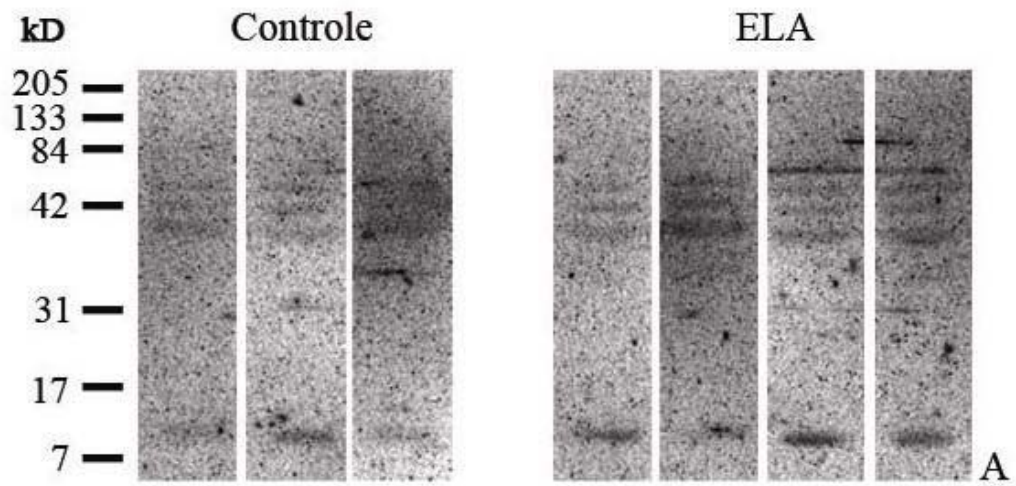
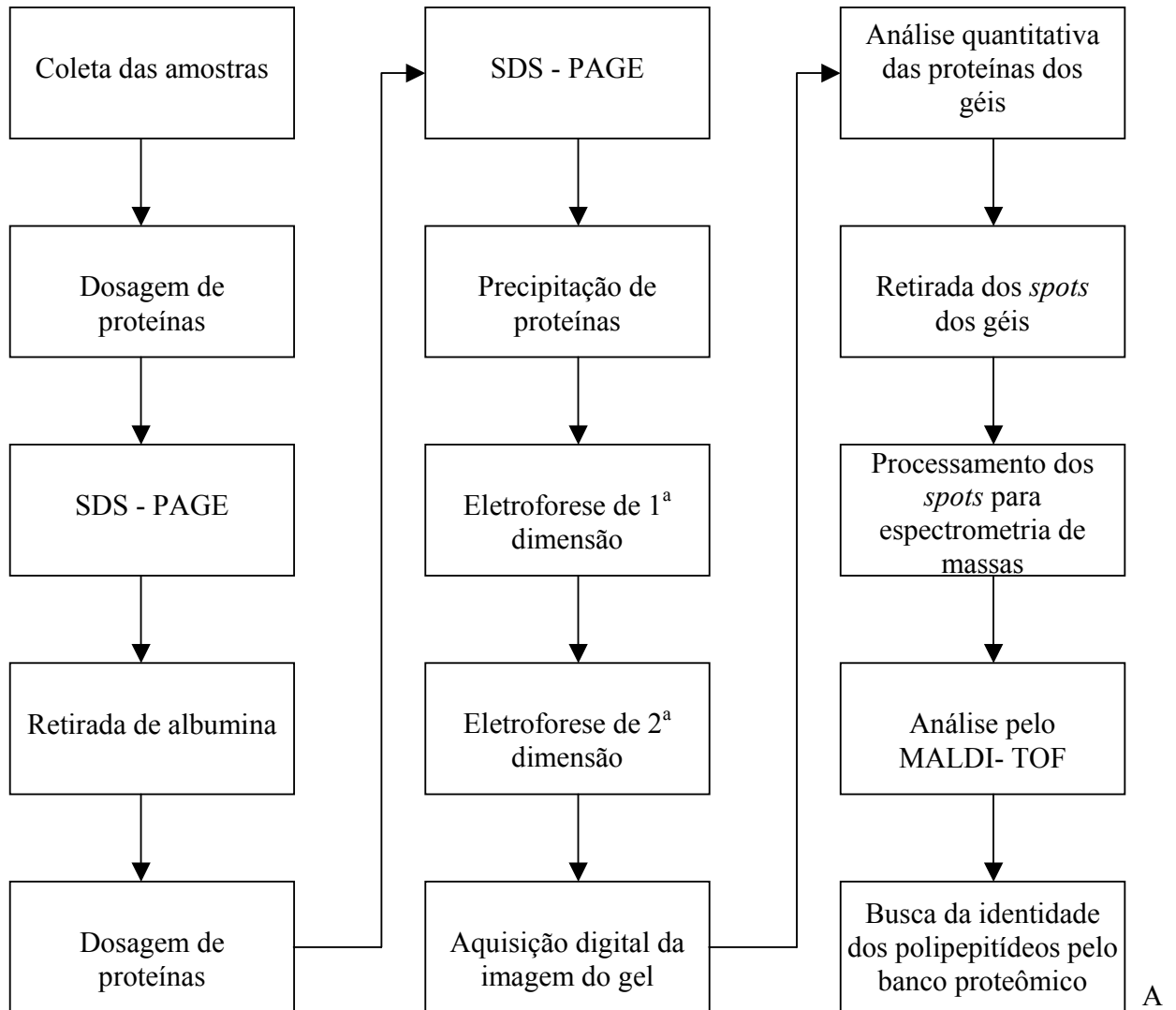
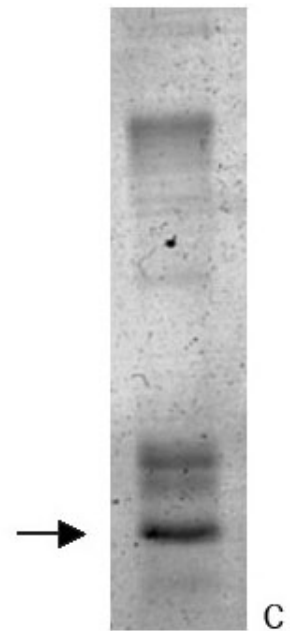
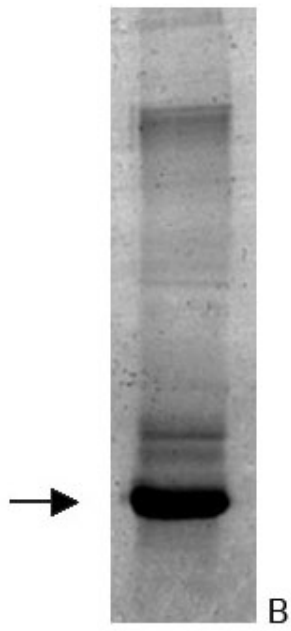
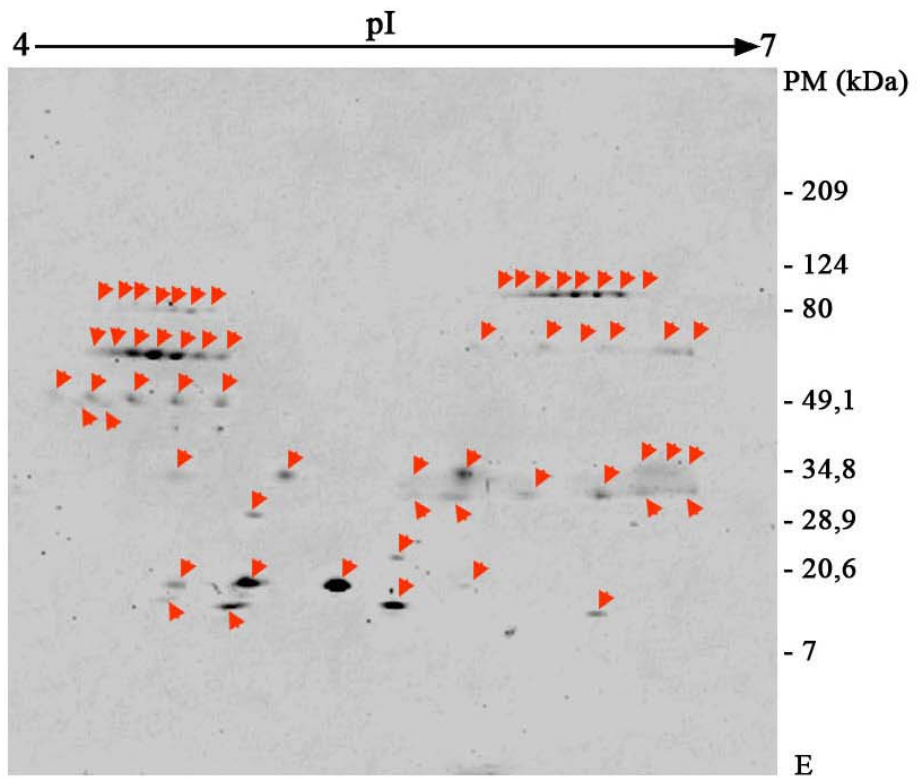
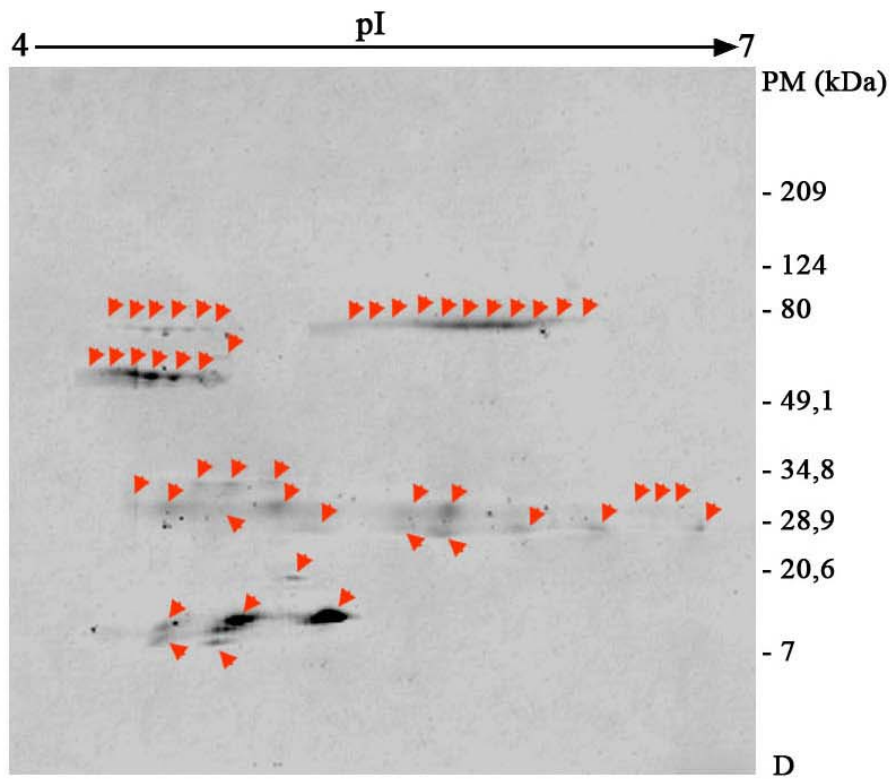


Figura 22. Análise Proteômica das Amostras de Líquido cefalorraquidiano de Pacientes Portadores de ELA e de Casos Controle (A-F). (A) Fluxograma de etapas realizadas para análise proteômica. (B) SDS-PAGE de amostra de líquido cefalorraquidiano onde é possível observar grande expressão da proteína albumina (seta). (C) SDS-PAGE de amostra de líquido cefalorraquidiano após retirada do excesso de albumina com Cibacrom Blue (seta). (D) Eletroforese bidimensional revelando a expressão de proteínas de *pool* de casos-controle. (E) Eletroforese bidimensional revelando a expressão de proteínas de caso de ELA. (F) Proteínas identificadas em *pool* de pacientes-controle. (G-I) Proteínas identificadas em três casos de ELA. (J) Proteínas identificadas em um dos casos de ELA e não identificadas nos casos-controle. (K) Proteínas identificadas em dois dos três casos de ELA analisados e não identificadas nos casos-controle.

FLUXOGRAMA







PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM *POOL* DE CASOS – CONTROLE (F)

IPI00646689 - Thioredoxin-like 5
IPI00022432 - Transthyretin precursor
IPI00448322 - Splice Isoform 3 of Calcyphosine-2
IPI00022432 - Transthyretin precursor
IPI00022432 - Transthyretin precursor
IPI00022432 - Transthyretin precursor
IPI00020393 - 28 kDa protein
IPI00022432 - Transthyretin precursor
IPI00022463 - Serotransferrin precursor
IPI00022432 - Transthyretin precursor
IPI00022432 - Transthyretin precursor
IPI00339310 - Splice Isoform 2 of Proto-oncogene DBL
IPI00385058 - Hypothetical protein
IPI00011710 - Axonemal dynein heavy chain
IPI00022463 - Serotransferrin precursor

PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM CASO DE ELA (G)

IPI00306778 - Stromelysin-3 precursor
IPI00306778 - Stromelysin-3 precursor
IPI00398676 - PREDICTED: hypothetical protein XP_373957
IPI00456316 - PREDICTED: hypothetical protein XP_498745
IPI00465346 - Receptor interacting protein kinase 5, isoform 1
IPI00553177 - Alpha-1-antitrypsin precursor
IPI00296863 - Deoxycytidylate deaminase
IPI00008438 - 40S ribosomal protein S10
IPI00022432 - Transthyretin precursor
IPI00022432 - Transthyretin precursor
IPI00298792 - 60 kDa protein
IPI00022432 - Transthyretin precursor
IPI00013323 - Cytochrome P450 2C19
IPI00107815 - TriparTite motif protein 34 isoform 2
IPI00478269 - Regulator of G-protein signalling 5
IPI00478269 - Regulator of G-protein signalling 5
IPI00022432 - Transthyretin precursor
IPI00101335 - SLC27A4 protein
IPI00442297 - Splice Isoform 2 of Neurotrimin precursor

PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM CASO DE ELA (H)

IPI00455101 - hypothetical protein XP_499075
IPI00022895 - Alpha-1B-glycoprotein precursor
IPI00396010 - Expressed in hematopoietic cells, heart, liver
IPI00022463 - Serotransferrin precursor
IPI00385811 - Hypothetical protein FLJ11294
IPI00022463 - Serotransferrin precursor
IPI00022463 - Serotransferrin precursor
IPI00022463 - Serotransferrin precursor
IPI00022463 - Serotransferrin precursor
IPI00470586 - Stem cell factor
IPI00384789 - Hypothetical protein FLJ39023
IPI00160835 - PREDICTED: similar to Transcription elongation factor B polypeptide 2 (RNA polymerase I
polymerase I
IPI00375477 - Mitochondrial ribosomal protein L21 isoform c
IPI00099464 - Splice Isoform 2 of Fizzy-related protein homolog
IPI00433171 - DEPC-1 protein
IPI00216071 - Eosinophil lysophospholipase
IPI00013398 - Hypothetical protein MGC4266
IPI00005404 - Splice Isoform 1 of Interleukin-1 family member 8
IPI00217823 - Zn-finger, DHHC type domain containing protein
IPI00430808 - Hypothetical protein
IPI00478544 - 18 kDa protein
IPI00478544 - 18 kDa protein
IPI00220360 - Small nuclear ribonucleoprotein associated protein N
IPI00444172 - Hypothetical protein FLJ46033
IPI00553177 - Alpha-1-antitrypsin precursor
IPI00553177 - Alpha-1-antitrypsin precursor
IPI00553177 - Alpha-1-antitrypsin precursor

IPI00553177 - Alpha-1-antitrypsin precursor
IPI00022957 - PRO0132
IPI00401115 - PREDICTED: hypothetical protein MGC39372
IPI00641082 - Ig kappa chain C region
IPI00430808 - Hypothetical protein
IPI00384355 - IGLC1 protein
IPI00384355 - IGLC1 protein
IPI00384355 - IGLC1 protein
IPI00550996 - IGKC protein
IPI00384355 - IGLC1 protein
IPI00430808 - Hypothetical protein
IPI00384355 - IGLC1 protein
IPI00299936 - HDCGC21P
IPI00549755 - Matrin 3
IPI00022432 - Transthyretin precursor
IPI00022432 - Transthyretin precursor
IPI00409599 - OxidOred-nitrO dOmain-cOntaining prOtein isOfOrm 2
IPI00332282 - Splice Isoform 2 of Parkin

PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM CASO DE ELA (I)

IPI00022432 - Transthyretin precursor

IPI00647891 - Lissencephaly type-1-like homology motif domain containing protein

IPI00022256 - Clathrin coat assembly protein AP50

IPI00011290 - Splice Isoform Short of Sulfotransferase 1C1

IPI00644218 - Lectin, galactoside-binding, soluble, 8

IPI00477389 - Putative N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase-like protein 2

IPI00022463 - Serotransferrin precursor

**PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM UM DOS CASOS DE ELA E NÃO
IDENTIFICADAS NOS CASOS – CONTROLE (J)**

IPI00455101 - hypothetical protein XP_499075
IPI00478544 - 18 kDa protein
IPI00478544 - 18 kDa protein
IPI00008438 - 40S ribosomal protein S10
IPI00298792 - 60 kDa protein
IPI00022895 - Alpha-1B-glycoprotein precursor
IPI00022256 - Clathrin coat assembly protein AP50
IPI00013323 - Cytochrome P450 2C19
IPI00296863 - Deoxycytidylate deaminase
IPI00433171 - DEPC-1 protein
IPI00216071 - Eosinophil lysophospholipase
IPI00396010 - Expressed in hematopoietic cells, heart, liver
IPI00299936 - HDCGC21P
IPI00385811 - Hypothetical protein FLJ11294
IPI00384789 - Hypothetical protein FLJ39023
IPI00444172 - Hypothetical protein FLJ46033
IPI00013398 - Hypothetical protein MGC4266
IPI00641082 - Ig kappa chain C region
IPI00550996 - IGKC protein
IPI00384355 - IGLC1 protein
IPI00384355 - IGLC1 protein
IPI00384355 - IGLC1 protein
IPI00384355 - IGLC1 protein
IPI00384355 - IGLC1 protein
IPI00644218 - Lectin, galactoside-binding, soluble, 8
IPI00647891 - Lissencephaly type-1-like homology motif domain containing protein
IPI00549755 - Matrin 3

IPI00375477 - Mitochondrial ribosomal protein L21 isoform c
IPI00409599 - Oxidoreductase domain-containing protein isoform 2
IPI00401115 - PREDICTED: hypothetical protein MGC39372
IPI00398676 - PREDICTED: hypothetical protein XP_373957
IPI00456316 - PREDICTED: hypothetical protein XP_498745
IPI00160835 - PREDICTED: similar to Transcription elongation factor B polypeptide 2 (RNA polymerase I
IPI00022957 - PRO0132
IPI00477389 - Putative N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase-like protein 2
IPI00465346 - Receptor interacting protein kinase 5, isoform 1
IPI00478269 - Regulator of G-protein signalling 5
IPI00478269 - Regulator of G-protein signalling 5
IPI00101335 - SLC27A4 protein
IPI00220360 - Small nuclear ribonucleoprotein associated protein N
IPI00005404 - Splice Isoform 1 of Interleukin-1 family member 8
IPI00099464 - Splice Isoform 2 of Fizzy-related protein homolog
IPI00442297 - Splice Isoform 2 of Neurotrimin precursor
IPI00332282 - Splice Isoform 2 of Parkin
IPI00011290 - Splice Isoform Short of Sulfotransferase 1C1
IPI00470586 - Stem cell factor
IPI00306778 - Stromelysin-3 precursor
IPI00306778 - Stromelysin-3 precursor
IPI00107815 - Tripartite motif protein 34 isoform 2
IPI00217823 - Zn-finger, DHHC type domain containing protein

**PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM UM DOIS DOS TRÊS CASOS DE ELA
ANALISADOS E NÃO IDENTIFICADAS NOS CASOS – CONTROLE (K)**

IPI00553177 - Alpha-1-antitrypsin precursor

IPI00553177 - Alpha-1-antitrypsin precursor

IPI00553177 - Alpha-1-antitrypsin precursor

IPI00553177 - Alpha-1-antitrypsin precursor

IPI00553177 - Alpha-1-antitrypsin precursor

Figura 23. Análise de Elementos-Traço no Líquido cefalorraquidiano de Portadores de ELA por Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (A-C). (A-C) Concentração de cálcio, cloro e potássio em microgramas por microlitro. Os três elementos apresentam concentrações significativamente aumentadas nas amostras de líquido cefalorraquidiano de portadores de ELA quando comparado aos casos-controle. Os outros elementos não apresentaram diferenças entre os dois grupos e não estão representados nesta figura.

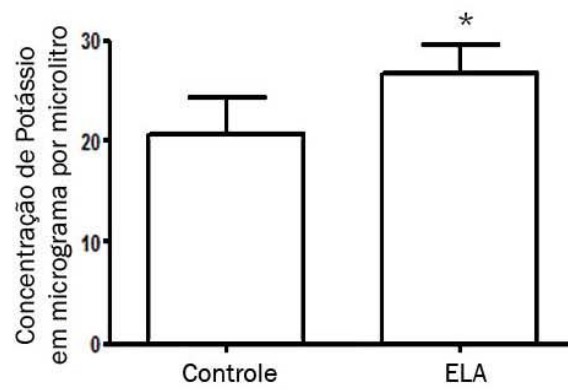
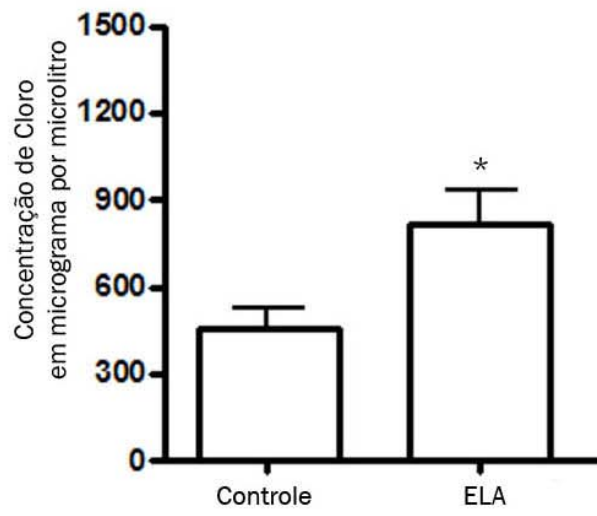
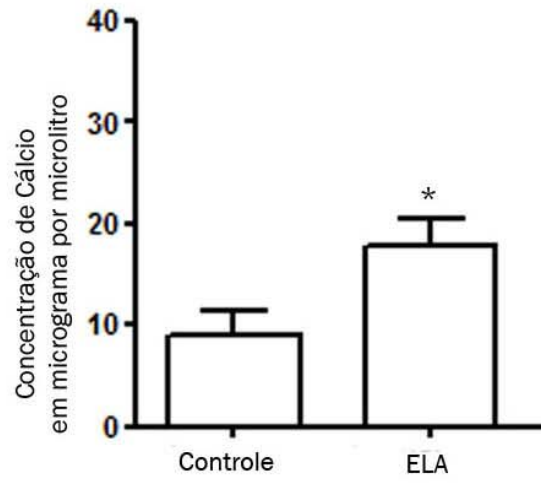
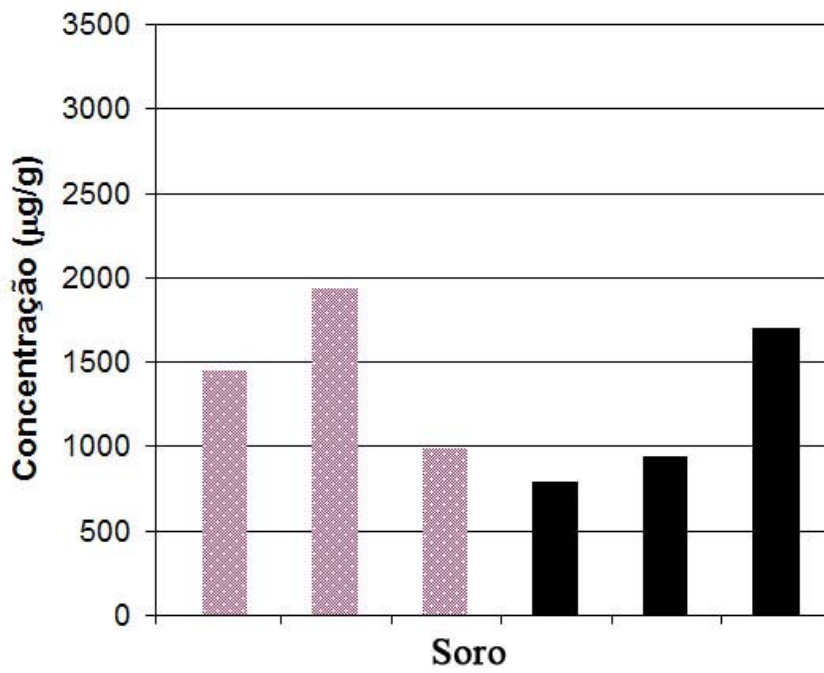
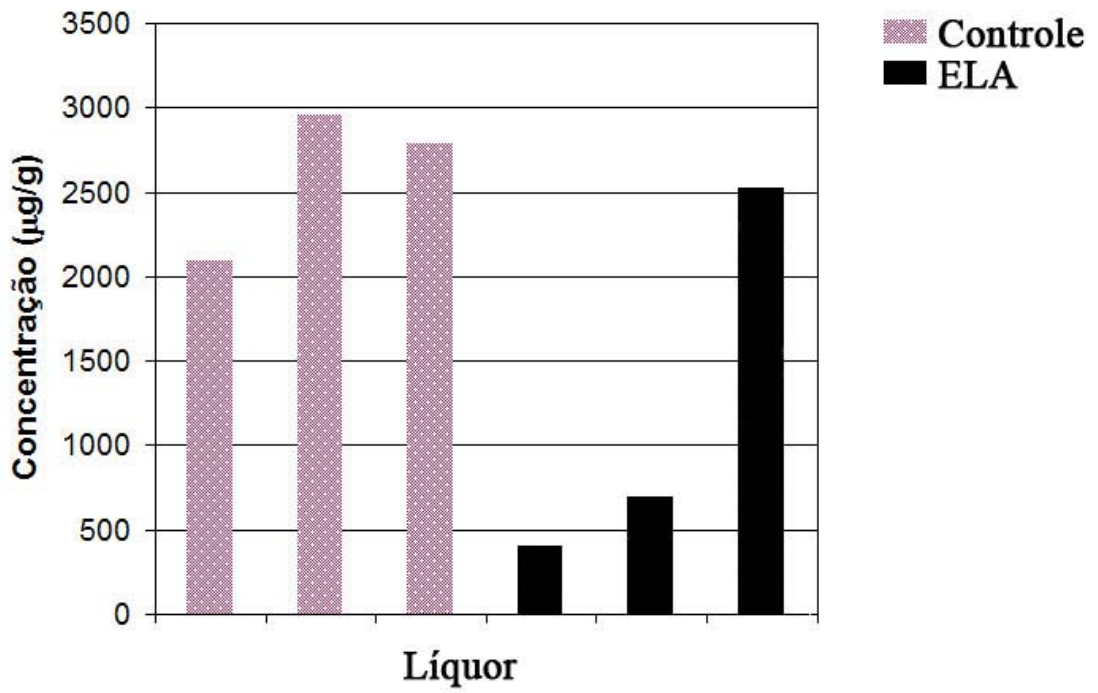
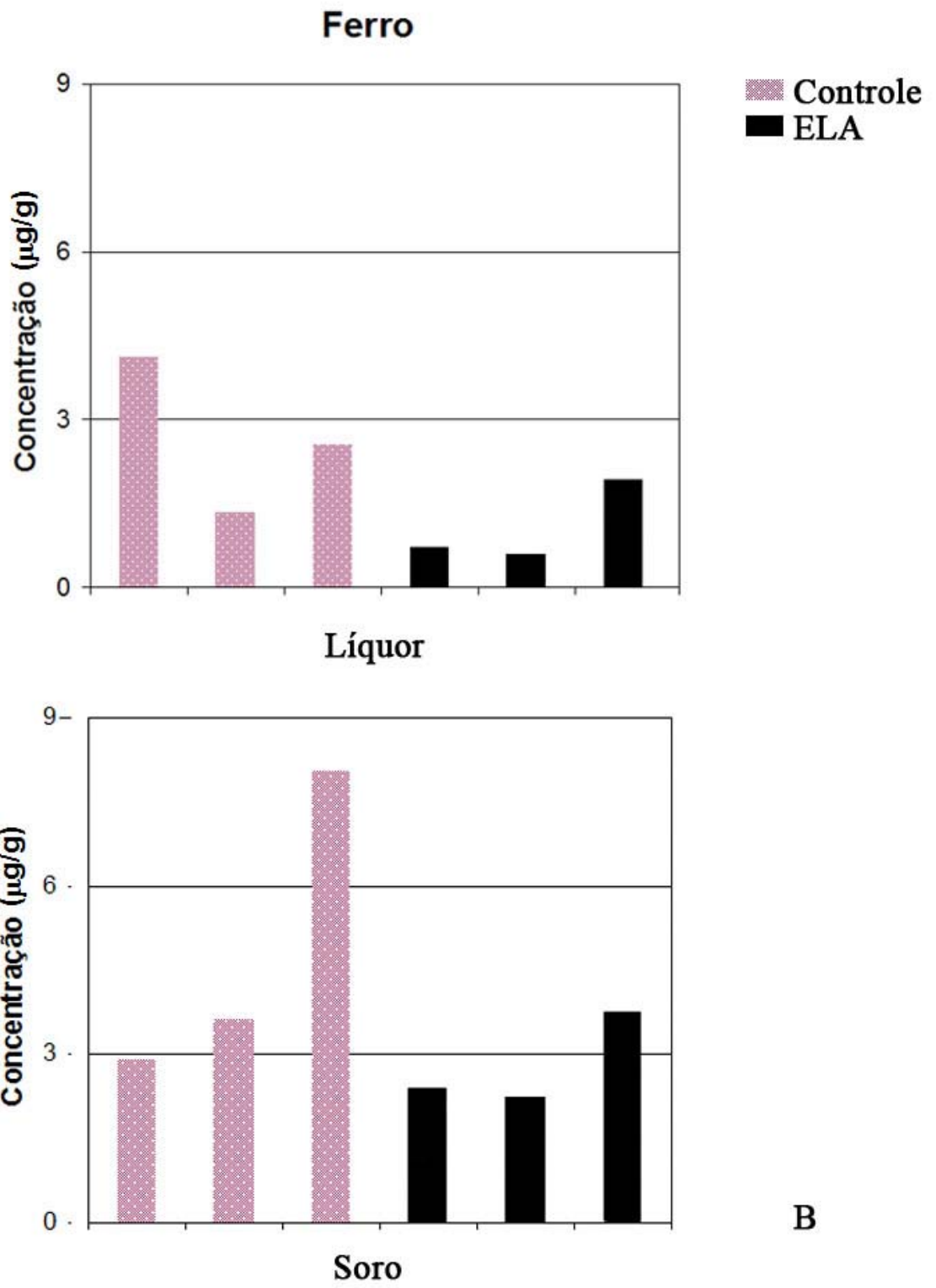


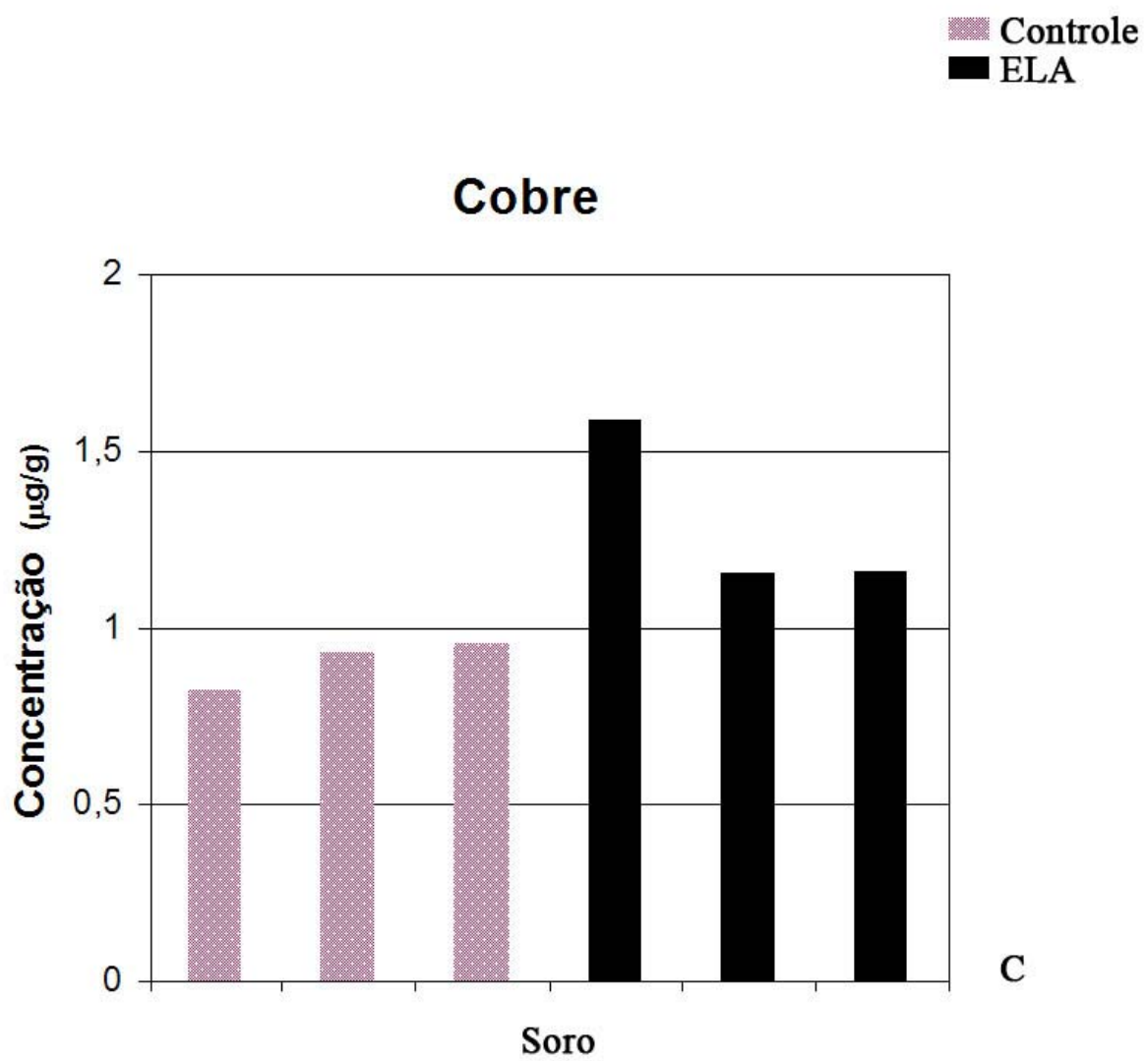
Figura 24. Análise de Elementos-Traço no Líquido cefalorraquidiano de Portadores de ELA por Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (A-C). (A-C) Concentração de alumínio, ferro e cobre em microgramas por microlitro. Os três elementos não apresentam concentrações significativamente aumentadas nas amostras de líquido cefalorraquidiano de portadores de ELA quando comparados aos casos-controle, porém em análise individual é possível observarmos padrões diferentes das concentrações destes elementos. (A,B) O alumínio e o ferro parecem apresentar maiores concentrações nas amostras de líquido cefalorraquidiano e soro dos pacientes de ELA. (C) O cobre parece apresentar-se mais concentrado no soro dos pacientes portadores da doença.

Alumínio



A





V.- DISCUSSÃO

V.1 – Características Gerais

A ELA é uma doença caracterizada pela degeneração progressiva dos neurônios motores somáticos. Acompanhando essa degeneração várias alterações morfológicas podem ser observadas, como por exemplo acúmulo de proteínas e desorganização do citoesqueleto neuronal (Ellison et al., 1988; Hirano, 1996; Lee e Cleveland, 1996; Bajaj et al, 1999; Julien, 1999; Strong, 2005).

Em nosso trabalho observamos intensa perda neuronal no corno anterior da medula espinhal dos pacientes portadores de ELA quando comparada aos controles. Alguns dos neurônios motores remanescentes apresentavam núcleo picnótico, caracterizando a degeneração neuronal, e regiões no pericário eram preenchidas por vacúolos. Além disso, achados possivelmente relacionados com o acúmulo de proteínas puderam ser observados, tais como: presença de pequenas inclusões eosinófilas intracitoplasmáticas (Bunina bodies); substância de Nissl deslocada para a periferia do corpo celular, ou mesmo alterações na forma, como por exemplo balonização de neurônios. Esses achados são compatíveis com os descritos na literatura (Rowland e Shneider, 2001).

Segundo Ross e Poirier (2004), as doenças neurodegenerativas esporádicas estão associadas com a idade. Por outro lado, modificações oxidativas de proteínas são eventos comuns na idade avançada. É sabido que a degeneração dos neurônios motores na ELA parece estar associada a múltiplos distúrbios e ao envelhecimento. A probabilidade de ocorrência de acúmulos de proteínas em doenças neurodegenerativas talvez se deva ao aumento da quantidade de proteínas ou a modificações em ligações covalentes dessas estruturas. É possível também que

haja uma diminuição da habilidade da célula em remover proteínas que devem ser degradadas, levando ao acúmulo das mesmas.

V.2 – Via Ubiquitina-Proteasoma e Neurônios Motores de Portadores de ELA

A via ubiquitina-proteasoma é formada por proteínas denominadas ubiquitina e pelo complexo proteolítico proteasoma 26S. A ubiquitina, através de várias cascatas enzimáticas, é responsável pelo reconhecimento e adesão a um substrato e encaminhamento deste substrato ao complexo proteolítico. Esta é, portanto, uma via de degradação importante no controle dos processos celulares básicos. Esta via está relacionada à degradação de proteínas celulares de vida curta, a proteínas que têm um papel crítico na proliferação celular e regulação do ciclo celular, assim como, de proteínas danificadas ou erroneamente montadas (Arendt e Hochstrasser, 1997; Zwickl e Baumeister, 2002).

Várias evidências demonstram que as doenças degenerativas do sistema nervoso são caracterizadas pelo acúmulo de proteínas (Strong, 2004). Dentre elas podemos citar os neurofilamentos, ubiquitina, tau e β -amilóide (Sasaki e Iwata, 1999; Yang et al., 2003; Calingasan et al., 2005). Em trabalho publicado (Mendonça et al., 2005) evidenciamos acúmulo de neurofilamentos, particularmente a subunidade pesada na sua forma fosforilada, nos corpos celulares dos neurônios motores e em esferóides axonais nos casos de ELA. Mais recentemente observamos marcação positiva para ubiquitina nos neurônios motores dos casos de ELA (skeins). Esta é uma alteração descrita como uma característica anátomo-patológica da doença (Chung et al., 2001). Além disso, estes neurônios apresentaram forte imunomarcação para proteasoma,

subunidades α e β , e pela análise quantitativa, a porcentagem de neurônios apresentando este aumento de imunomarcagem foi significativa em todos os níveis medulares.

Nossos resultados são diferentes da maioria dos trabalhos anteriores que afirmam que neurônios motores de casos de ELA esporádica e familiar não são positivos para proteasoma 20S (Watanabe et al., 2001). Curiosamente, Seihhean e colaboradores (2004) apresentaram evidências de inclusões positivas para proteasoma 19S mas não para proteasoma 20S em um caso de ELA esporádica. Entretanto, estes autores observaram essas inclusões positivas apenas em neurônios piramidais do hipocampo e não nos neurônios motores da medula espinhal. Outra diferença importante entre nossos trabalhos é que utilizamos um anticorpo que reconhece as subunidades α e β , enquanto eles utilizaram anticorpos que reconhecem a partícula 19S e apenas a subunidade α do proteasoma 20S.

Proteínas ubiquitinadas são degradadas pelo proteasoma 26S através do trabalho conjunto da partícula 19S que contém ATPases e outras enzimas, e a subunidade 20S que contém o centro proteolítico ativo. É possível, portanto, sugerir que alterações em quaisquer das subunidades do proteasoma poderiam, por exemplo, levar a uma deficiência em seu funcionamento. Uma das funções do sistema ubiquitina-proteasoma é remover proteínas danificadas ou erroneamente montadas (Ding e Keller, 2001). Agregados protéicos anormais podem gerar um aumento nos níveis de proteólise no compartimento intracelular, que poderia levar ao recrutamento de *pools* citosólicos de ubiquitina e proteasoma. Esta observação poderia explicar o aumento de imunorreatividade para ubiquitina e proteasoma em algumas regiões dos corpos celulares dos neurônios motores e seus prolongamentos, como observado em nosso trabalho. Além disso, acúmulo de proteínas como ubiquitina, neurofilamentos, tau e β -amilóide (Sasaki e Iwata, 1999; Yang et al., 2003; Calingasan et al, 2005) são características comuns da doença. O acúmulo de proteínas pode torná-las inacessíveis à proteólise pela via ubiquitina-proteasoma. Esta diminuição

na degradação pode ocorrer como consequência de alterações oxidativas das proteínas agregadas, devido à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Outro mecanismo possível estaria relacionado ao funcionamento inadequado do complexo enzimático, e conseqüentemente não seria capaz de degradar estas proteínas que se acumulariam em neurônios saudáveis.

Segundo Alves-Rodrigues e colaboradores (1998), nos estágios iniciais de injúria celular, quando o ATP é suficiente e o centro proteolítico ainda se mantém funcionando, as proteínas ubiquitinadas são degradadas. Nesse momento pode ser que ocorra um aumento na produção de proteínas de ubiquitina, na tentativa de restaurar o funcionamento normal da célula, eliminando proteínas danificadas. Porém, uma sobrecarga na via ubiquitina dependente de ATP pode enfraquecer a resposta neuronal às condições de estresse. As proteínas danificadas, porém ubiquitinadas, não são degradadas e formam então agregados, levando à morte celular.

O papel da via ubiquitina-proteasoma tem sido pesquisado em outras doenças neurodegenerativas, como por exemplo Parkinson, Alzheimer e doença de Huntington. A análise genômica de casos de portadores de doença de Parkinson na forma familiar evidenciou mutações em proteínas como a parkina e a UchL1. Parkina é uma enzima relacionada à cascata de ativação da ubiquitina (Kitada et al., 1998) e UchL1 pertence a uma família de enzimas responsáveis pela degradação de cadeias poliubiquitina (Larsen et al., 1998). Não existem evidências de mutações em proteínas relacionadas à via ubiquitina-proteasoma em casos de Alzheimer e doença de Huntington, mas inibição do proteasoma ou acúmulos de proteínas que conduzem ao mau funcionamento da via são discutidos em diversos trabalhos (Chung et al., 2001; Valera et al., 2005; Almeida et al., 2006).

V.3 – Via Ubiquitina-Proteasoma e Astrócitos em Portadores de ELA

Os astrócitos são células que possuem forte interação com os neurônios e são importantes para a manutenção do microambiente neuronal. Dentre as características patológicas da ELA podemos citar intensa astrocitose (Eddleston e Mucke, 1993; Layfield et al., 2001; Barbeito et al., 2004) e, em função disso, vários estudos têm fornecido evidências para a participação dos astrócitos na patogênese da doença (Benarroch, 2005; Seifert et al., 2006). Um possível mecanismo patogênico que pode contribuir para a doença é a excitotoxicidade promovida por elevados níveis de glutamato, que por sua vez ativa ROS nos neurônios motores. Os níveis extracelulares de glutamato são regulados por transportadores presentes nas membranas dos astrócitos (Anderson et al., 2000). Parece que o aumento da produção de ROS induz disfunções nestes transportadores causando aumento nos níveis de glutamato, que é sabidamente um evento tóxico para o neurônio motor. Essa disfunção pode estar relacionada com disfunções nos transportadores presentes nos astrócitos e que, por sua vez, pode estar relacionada com o funcionamento inadequado da via ubiquitina-proteasoma.

Nossos resultados sugerem que a via ubiquitina-proteasoma está envolvida na patogênese da ELA, já que evidenciamos forte expressão de ubiquitina e proteasoma na medula espinhal em casos de ELA. Esse aumento de expressão pode evidenciar disfunção desta via em neurônios e astrócitos de casos de ELA. A via ubiquitina-proteasoma pode estar envolvida direta ou indiretamente na patogênese da doença e esta disfunção pode alterar o metabolismo neuronal levando os neurônios à degeneração. Pode também afetar o metabolismo dos astrócitos, que por sua vez irão alterar os neurônios. Nossos resultados estão de acordo com a recente opinião que a ELA, assim como outras doenças neurodegenerativas, é uma desordem de acúmulo de proteínas que afeta os neurônios (Strong, 2004; Strong e Kesavapany, 2005) e células não-neuronais, como

por exemplo os astrócitos (Brujin et al., 1997) e microglia (Sargsyan et al., 2005; Boillee et al., 2006).

V.4 – Neurofilamentos e Líquido cefalorraquidiano de Portadores de ELA

Em nosso trabalho investigamos a presença de neurofilamentos no líquido cefalorraquidiano de portadores de ELA e de casos-controle. Os neurofilamentos estão presentes nos neurônios em grande quantidade e são importantes elementos estruturais específicos do citoesqueleto neuronal (Carden et al., 1987; Heins et al., 1993; Julien, 1999; Garcia et al., 2003). Participam da arquitetura neuronal através da formação de redes tridimensionais de filamentos que orientam sua forma, auxiliam na definição do diâmetro do axônio e manutenção desse calibre, o que por sua vez determina a velocidade de condução axonal (Hirokawa, 1984; Hoffman et al., 1984; Lee e Cleveland, 1996).

Os neurofilamentos são compostos de três subunidades: NF-L (leve), NF-M (médio) e NF-H (pesado) (Hoffman e Lasek, 1975; Schlaepfer et al., 1978; Napolitano et al., 1987). Cada uma dessas subunidades é produto de um gene distinto. O neurofilamento é formado por um filamento central, que é composto das três subunidades, mas principalmente a subunidade leve, e projeções laterais, projeções essas formadas pelas subunidades média e pesada dos neurofilamentos. As projeções laterais são responsáveis pela interação do filamento com outras estruturas presentes no axoplasma. Após sua síntese no pericário, as três subunidades de neurofilamentos são montadas no citoplasma e movidas para dentro do axônio (Lee e Cleveland, 1996; Julien, 1999). Em geral essas proteínas se encontram em um equilíbrio dinâmico, resultando em um intercâmbio contínuo de subunidades de proteínas e formas polimerizadas.

Uma característica patológica da ELA esporádica e da ELA familiar, incluindo casos ligados a mutações em SOD1, é a presença de acúmulo de neurofilamentos no pericário e axônios dos neurônios motores (Julien, 1999; Mendonça et al., 2005). Os grandes neurônios com axônios de grande calibre e alta velocidade de condução requerem uma enorme quantidade de neurofilamento. Os neurônios motores, que estão entre os maiores neurônios do sistema nervoso, são, portanto, ricos em proteínas de neurofilamentos (Watson, 1991), estando mais susceptíveis a alterações dessas proteínas. Esta seria uma das possíveis explicações para a vulnerabilidade desses neurônios em casos de ELA. Além disso, a excitotoxicidade por glutamato induz ao aumento dos níveis de cálcio intracelular. Os neurônios motores têm menor capacidade em tamponar o cálcio (Alexianu et al., 1994) e, conseqüentemente, poderiam tornar as proteínas de neurofilamentos mais susceptíveis a alterações.

Acúmulos de proteínas de neurofilamento, principalmente em suas formas fosforiladas, no pericário neuronal e dendritos são componentes freqüentes da reação dos neurônios à injúria axonal em humanos, assim como em animais experimentais, e esse acúmulo conduz a alterações no transporte axonal (Hedreen et al., 1994). Essa observação sugere que nas doenças degenerativas o acúmulo de neurofilamentos, principalmente em sua forma fosforilada, também pode ser indicativo de comprometimento do transporte axonal em neurônios afetados. A homeostasia celular também pode ser acometida por outros mecanismos. Por exemplo, neurônios motores cultivados e tendo acúmulo de neurofilamentos demonstram elevado influxo de cálcio mediado por receptores NMDA em resposta a estímulo glutamatérgico (Strong e Kesavapany, 2005). Em trabalho realizado por Sanelli e colaboradores (2004) foi observado que, quando há acúmulo de neurofilamentos, de alguma forma, estes sequestram óxido nítrico sintase neuronal, impedindo sua translocação para a superfície da membrana celular, onde normalmente esta molécula atuaria inibindo os receptores NMDA, que por sua vez inibem o influxo de cálcio.

As alterações na estrutura molecular das proteínas de neurofilamentos podem, portanto, afetar a integridade e a sobrevivência neuronais (Anderton et al., 1987). O acúmulo de neurofilamentos pode ser um evento primário na patogênese da doença ou pode ser consequência de fatores descritos como possíveis agentes desencadeadores da doença, tais como estresse oxidativo, excitotoxicidade ou disfunção mitocondrial (Julien, 2001). Giasson e Mushynski (1996) demonstraram que mediante fatores de estresse celular ocorre hiperfosforilação da subunidade pesada dos neurofilamentos. Segundo Strong e Kesavapany (2005) vários eventos podem induzir a desregulação da fosforilação, como resultado de uma ativação anormal da cascata de cinases durante condições patológicas. Portanto, a desregulação da atividade das cinases em processos patológicos poderia conduzir a hiperfosforilação destas proteínas nas doenças neurodegenerativas.

Além dos fatores de estresse celular, as mutações nos genes que codificam estas proteínas podem contribuir para a sua desorganização. Mutações envolvendo os neurofilamentos em casos de ELA esporádica foram evidenciadas em trabalho de Figlewicz e colaboradores (1994). O grupo evidenciou deleções na região carboxiterminal da subunidade pesada dos neurofilamentos e sugere que essas mutações podem conduzir ao acúmulo de neurofilamento. É interessante observar que mesmo nos casos familiares, com mutações no gene que codifica a enzima SOD1, o acúmulo de neurofilamentos é uma característica patológica evidente. O mecanismo patogênico da doença parece, portanto, ter íntima relação com a desorganização das proteínas de neurofilamentos e várias evidências sugerem que a subunidade pesada talvez desempenhe papel crucial nessa desorganização. Segundo Plummer e colaboradores (1995) a degeneração talvez possa ocorrer em indivíduos com alterações discretas nos neurofilamentos pesados e a consequente desorganização seja dependente de fatores adicionais, como estresse de ordem genética ou ambiental. Em nosso trabalho evidenciamos a presença da subunidade pesada

fosforilada dos neurofilamentos em líquido cefalorraquidiano de sete dos dez casos estudados de portadores de ELA, enquanto nos casos-controle não houve expressão da subunidade. Em relação aos achados nos casos de ELA, esta é uma porcentagem representativa do total de casos utilizados neste experimento. As subunidades média e leve não foram encontradas nas amostras estudadas. Os anticorpos utilizados nestas análises foram utilizados em trabalho anterior (Mendonça et al., 2005) e mostraram especificidade em relação às subunidades estudadas.

Alterações na organização dos neurofilamentos induzidas, por exemplo, por alteração nos estados de fosforilação (Julien, 2001) associadas à perda da integridade da membrana durante a degeneração dos neurônios motores poderia explicar a presença da subunidade pesada de neurofilamento no líquido cefalorraquidiano destes pacientes. Nossos resultados sugerem que a subunidade pesada dos neurofilamentos pode ser usada como biomarcador para o diagnóstico da ELA.

Pesquisadores investigaram a presença das proteínas de neurofilamento pesado e tau no líquido cefalorraquidiano de portadores de ELA (Brettschneider et al, 2006) e Alzheimer (Brettschneider et al, 2006). Rosengreen e colaboradores (1996) analisaram a presença da subunidade leve dos neurofilamentos no líquido cefalorraquidiano de portadores de ELA e de Alzheimer. Em ambos experimentos as amostras foram imunoprecipitadas com anticorpos e as respectivas concentrações foram analisadas com ELISA. Nos dois trabalhos os autores relatam aumento na concentração de neurofilamentos (subunidade pesada e leve, respectivamente) nos casos de ELA quando comparado aos casos utilizados como controle, mas frações de neurofilamentos são evidenciadas no grupo controle. Isto sugere imprecisão da técnica utilizada. Além disso, analisando seus gráficos pode-se observar importante desvio padrão das amostras analisadas.

V.5 – Proteasoma e Líquido cefalorraquidiano de Portadores de ELA

Em nosso trabalho investigamos a presença do proteasoma, subunidades α e β , no líquido cefalorraquidiano de portadores de ELA e de casos-controle e não evidenciamos a presença dessas subunidades em nenhum dos grupos. A proposta de pesquisarmos as subunidades α e β do proteasoma surgiu dos resultados obtidos anteriormente na análise imunohistoquímica onde evidenciamos o aumento qualitativo e quantitativo da expressão do proteasoma nos corpos celulares dos neurônios motores nos casos de ELA, o que seria condizente com a idéia de que os níveis de proteasoma aumentariam na tentativa de degradar proteínas erroneamente montadas e, assim como os neurofilamentos, estas subunidades poderiam alcançar a corrente liquórica.

O proteasoma é um complexo multiprotéico que constitui a principal via não-lisosomal de degradação celular. Por determinar os níveis de proteínas-chaves, o proteasoma desempenha importante papel em vários processos biológicos (Hershko e Ciechanover, 1998; Voges et al., 1999). O proteasoma 20S é formado por 14 subunidades diferentes: 7 subunidades α e 7 subunidades β organizadas na forma de uma estrutura cilíndrica (Voges et al., 1999). Complexos regulatórios, como o complexo 19S, podem se associar ao proteasoma 20S. Esta associação, em particular, dá origem ao proteasoma 26S.

O proteasoma é uma estrutura dinâmica capaz de formar múltiplas interações transitórias com diferentes subunidades e fatores celulares importantes. Segundo Zwickl e Baumeister (2002) a localização do proteasoma está relacionada à regulação da proteólise. Alterações intracelulares geram rápida associação ou desassociação das subunidades formadoras do proteasoma. Sob condições leves de estresse, os níveis de proteasoma aumentam rapidamente para que haja degradação das proteínas danificadas (Bajorek et al., 2003; Imai et al., 2003; Glickman e Raveh, 2005). Satoh e colaboradores (2001) evidenciaram desassociação das subunidades do proteasoma

após tratamento com fosfatases. A fosforilação está relacionada com a associação das subunidades formadoras do complexo, aumentando enormemente a associação das diferentes subunidades e estabilizando o proteasoma 26S (Glickman e Raveh, 2005).

Nossas evidências referentes ao aumento da expressão de proteasoma nos corpos celulares nos casos de ELA, possivelmente, devem estar relacionadas à tentativa de restaurar o funcionamento celular através do aumento de degradação de proteínas danificadas. É possível que de alguma forma as subunidades do proteasoma se desorganizem, tornando impossível seu reconhecimento no líquido cefalorraquidiano dos pacientes portadores da doença.

Até o momento não há relatos de pesquisas de proteasoma no líquido cefalorraquidiano de casos de ELA ou em outras doenças neurodegenerativas. Apesar de não termos encontrado vestígios das subunidades α e β do proteasoma no líquido cefalorraquidiano dos pacientes portadores de ELA, mais estudos são necessários para o maior entendimento do papel deste complexo protéico na patogênese da doença.

V.6 – Resíduos de Nitrotirosina em Líquido cefalorraquidiano e Soro de Portadores de ELA

Recentes evidências dão suporte à idéia de que os mecanismos participantes da degeneração dos neurônios motores, como excitotoxicidade, disfunção mitocondrial, acúmulo de neurofilamentos ou alteração na via ubiquitina-proteasoma, podem ser coordenados pelo estresse oxidativo, o qual pode ativar diferentes vias que levam a um aumento adicional deste estresse, amplificando o mecanismo patogênico da doença (Rakhit et al., 2002; Simpson et al., 2003).

A hipótese da relação causal entre estresse oxidativo e a ELA surgiu da identificação de propriedades tóxicas da enzima SOD1 mutante em casos de ELA familiar. A partir da identificação de marcadores de estresse oxidativo no córtex e na medula espinhal de portadores de ELA familiar e esporádica (Bowling et al., 1993; Beal et al., 1997; Ferrante et al., 1997), observou-se que casos de ELA esporádica também apresentam indícios de estresse oxidativo. Dentre os marcadores de estresse oxidativo utilizados podemos citar a nitrotirosina. A nitrotirosina tem chamado maior atenção em função da enorme tendência da enzima mutante SOD1 em usar o peroxinitrito como um substrato, levando à nitração de tirosina (Beckman et al., 1992).

Fisiologicamente, a partir de eventos decorrentes do metabolismo celular, elementos contendo resíduos de nitrotirosina, oxidados ou glicosilados, podem ser drenados para a corrente líquórica (Thornalley et al., 2003; Ahmed et al., 2005) e esta drenagem pode aumentar à medida que mais modificações protéicas ocorram, o que é freqüentemente observado nas doenças neurodegenerativas. De fato, níveis aumentados de nitrotirosina livre foram identificados em medula espinhal de camundongos-modelos de ELA (Bruijin et al., 1997; Klivenyi et al., 2000), em medula espinhal de portadores de ELA esporádica e familiar (Beal et al., 1997) e no líquido cefalorraquidiano de portadores de ELA esporádica (Tohgi et al., 1999). Diferente dos autores citados, em nosso trabalho avaliamos os níveis de nitração das proteínas presentes no líquido cefalorraquidiano de pacientes portadores de ELA em comparação com os casos controle e observamos que a expressão de nitrotirosina foi similar em ambos os grupos, não havendo diferenças consideráveis entre os casos estudados.

Segundo Schopfer e colaboradores (2003) a nitração de proteínas é um mecanismo celular de sinalização. De fato, tem sido demonstrado que a nitração de proteínas é um processo seletivo e reversível, assim como a fosforilação (Aulak et al., 2004), o que pode explicar a presença de

proteínas nitradas nos casos-controle utilizados em nosso trabalho. Além disso, ausência de condições patológicas não implica na ausência concomitante de fatores de estresse oxidativo. Atualmente sabemos que diversas condições podem aumentar a produção de radicais livres no organismo.

A possibilidade de problemas técnicos com relação à detecção de proteínas nitradas também não pode deixar de ser citada. É possível que a técnica não tenha sido sensível a alterações de pequenas quantidades de proteína ou que a quantidade de proteína utilizada tenha sido insuficiente para tal análise. Segundo Greenacre e Ischiropoulos (2001) a observação de resíduos de nitrotirosina não é tão comum em fluídos. Sendo assim, se a concentração de proteínas fosse maior talvez tivesse sido possível evidenciar alguma diferença entre os grupos, mas isso não foi possível porque a quantidade de proteínas no líquido cefalorraquidiano é pequena, não tendo sido suficiente para uma análise mais apurada.

V.7 – Análise Proteômica de Líquido cefalorraquidiano de Portadores de ELA

A partir da metade da década de noventa do século passado até a presente data, com o término do sequenciamento do genoma humano, a necessidade de analisar a expressão protéica se faz crescente. A área de estudos de proteômica tem recebido grandes investimentos e a expectativa é que se descortinem novas respostas para o funcionamento de vários mecanismos celulares.

Recentemente, a identificação de padrões de expressão protéicos diferenciais passou a ter extrema importância para a identificação de proteínas relacionadas a diversos processos biológicos, despertando o interesse de vários grupos de pesquisa. Com essa abordagem é possível

a comparação de extratos protéicos em condições fisiológicas ou patológicas diferentes. A separação das proteínas por ponto isoelétrico e por peso molecular permite a identificação de proteínas desconhecidas, (através de Espectrometria de Massa) possibilitando o esclarecimento de várias funções celulares, fornecendo perfis de expressão protéica de diversas patologias e também auxiliando o desenvolvimento de medicamentos mais específicos e eficientes.

A análise dos padrões protéicos do líquido cefalorraquidiano em doenças neurodegenerativas tem sido foco de grande interesse (Zhang et al., 2005; Abdi et al., 2006; Castano et al., 2006). No líquido cefalorraquidiano normal, 80% do teor proteico é transudato do plasma e os 20% restantes são sintetizados no SNC. O líquido cefalorraquidiano contém uma quantidade muito pequena de proteínas, com concentrações normais entre 15,0 e 45,0 mg/dL e uma fração de cerca de 50% a 75% deste total correspondem à albumina. (Deisenhammer et al., 2006). A elevação dos valores de proteínas no líquido cefalorraquidiano é observada em várias situações, como por exemplo, comprometimento da barreira hematoencefálica, produção de imunoglobulinas no sistema nervoso central, redução da depuração das proteínas do líquido cefalorraquidiano e degeneração do tecido neural (Deisenhammer et al., 2006).

Em nosso trabalho, inicialmente nos preocupamos em estabelecer a purificação das amostras de líquido cefalorraquidiano a serem estudadas. Devido à complexidade das amostras biológicas, diversas etapas de purificação são exigidas para sua análise. Conseguimos estabelecer as condições ideais de purificação das amostras de líquido cefalorraquidiano e estabelecemos as condições para a realização da eletroforese bidimensional. Após a realização da eletroforese bidimensional analisamos comparativamente o padrão protéico do líquido cefalorraquidiano de pacientes portadores de ELA e de pacientes utilizados como controle e foi possível evidenciar diferenças na expressão de proteínas entre ambos os grupos. Nos casos de ELA é possível observar maior número de *spots* de proteínas quando comparado aos casos-controle. A maioria

das proteínas expressas nos casos de ELA e não observadas nos casos-controle se concentram em uma faixa de pH em torno de 6 a 7 e com peso molecular variando entre 7 a 35 kDa. Todos os *spots* foram retirados para análise pela técnica de MALDI-TOF, porém, até o momento apenas o pool de casos controle e três casos de ELA tiveram suas proteínas identificadas. As proteínas foram identificadas através de seus mapas peptídicos e pontos isoelétricos. O programa disponível na internet *Protein Prospector Search software 4.0.5 (University of Califórnia, San Francisco Mass Spectrometry Facility)* contém diversos bancos de dados originários de vários programas de seqüenciamento no mundo todo. As seqüências a serem depositadas nos bancos de dados são digeridas teoricamente e os mapas peptídicos teóricos serão comparados aos mapas submetidos à busca. Estão sendo utilizados na identificação das proteínas os bancos de dados NCBI e SWISS *protein*.

Ranganathan e colaboradores (2005) realizaram análise de líquido cefalorraquidiano de portadores de ELA através da técnica SELDI-TOF-MS (Mass Spectrometry Laser Desorption Ionization – Time of Flight) e observaram espectros protéicos que foram submetidos a imunoblotting. Os resultados mostraram diferenças significativas entre as amostras do grupo de portadores de ELA e amostras do grupo controle. Eles identificaram três possíveis biomarcadores: transtirretina, cistatina c e um fragmento de uma proteína neuroendócrina, a 7B2. Em nossa análise identificamos precursores de transtirretina nos casos controle e nos casos de ELA e não identificamos as outras proteínas descritas pelo grupo em nossos casos de ELA analisados até o momento. Várias proteínas foram identificadas nos casos de ELA e não identificadas nos casos-controle, porém estas proteínas não se repetiram entre os casos de ELA. Apenas o precursor de alfa 1 antitripsina foi identificada em dois dos três casos de ELA analisados. Para a sugestão da utilização de uma dessas proteínas como biomarcador será necessário a análise dos outros casos de ELA.

V.8 – Fluorescência de Raios X por Reflexão Total e Líquido cefalorraquidiano de Portadores de ELA

A degeneração dos neurônios motores na ELA está relacionada a vários fatores, como por exemplo: estresse oxidativo, excitotoxicidade, acúmulo de proteínas e disfunção mitocondrial. Os metais desempenham importante papel em nosso organismo em condições normais e em condições patológicas. Em todos os processos descritos acima pode haver alterações em moléculas intracelulares importantes, como os ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (Chwiej et al., 2005). Produtos gerados por metabolismo anormal ou a presença aumentada de elementos antioxidantes refletem a destruição da homeostasia intracelular (Cassarino e Bennet, 1999). A comparação entre a distribuição dos elementos entre situações normais e casos patológicos pode ser útil para a identificação de fatores relacionados com vários processos nosológicos. Por exemplo, na ELA, em sua forma familiar, a enzima SOD1 mutante apresenta instabilidade que contribui para a toxicidade que, às vezes, é aumentada pela liberação de zinco (Strong e Kesavapany, 2005). O cobre é um elemento, em particular, intimamente relacionados a doenças neurodegenerativas. O íon cobre promove agregação de proteínas e também participam do estresse oxidativo (Bush, 2000). O ferro se acumula progressivamente no cérebro com o avançar da idade e induz o estresse oxidativo que pode levar ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Kishi et al., 1982). O ferro está relacionado ao transporte de oxigênio, transporte de elétrons e vários outros processos metabólicos importantes (Kishi et al 1982).

Alguns elementos têm sua concentração aumentada com a idade, outros a tem diminuída e outros ainda, não exibem um padrão consistente (Serpa et al., 2006). Segundo Bertoni-Freddari e colaboradores (2006), por exemplo, a diminuição de zinco está relacionada diretamente com disfunções mitocondriais, e estas disfunções são características do envelhecimento e, além disso,

esta diminuição de zinco é evidente em várias doenças neurodegenerativas. Portanto, o estudo dos elementos-traço é importante em função de sua relevância na idade e em condições patológicas do sistema nervoso.

Em nosso trabalho comparamos a concentração de diferentes metais no líquido cefalorraquidiano e no sangue de portadores de ELA e comparamos com os casos-controle. Observamos diferenças significativas na concentração de cálcio, cloro e potássio, enquanto que os outros elementos estudados não exibiram diferenças significativas entre os grupos. Cloro e potássio, sabidamente, são elementos presentes em maior concentração no meio intracelular do que no meio extracelular (Bear et al., 2001). É possível que após o rompimento das membranas neuronais, em consequência da degeneração destas células, as concentrações de cloro e potássio aumentem no líquido cefalorraquidiano. Talvez esta seja uma explicação para o aumento da concentração destes elementos em nossa análise. Já o cálcio é um elemento encontrado em menor concentração no meio intracelular quando comparado a suas concentrações no meio extracelular (Bear et al., 2001), porém a quantidade encontrada no meio intracelular, mesmo que pequena, pode contribuir para a concentração total do elemento após rompimento das membranas neuronais.

Os outros elementos estudados, entretanto, não apresentaram diferenças significativas em suas concentrações quando comparamos amostras dos dois grupos. Porém, apesar de não observarmos diferenças através da análise estatística, alguns elementos parecem exibir importantes variações em suas concentrações em relação aos dois grupos analisados. O alumínio e o ferro parecem estar menos concentrados tanto no líquido cefalorraquidiano quanto no soro de portadores de ELA quando comparados aos casos-controle. Já o cobre parece estar aumentado no soro dos portadores da doença. Talvez fosse necessário maior número de amostras para avaliar a existência de reais diferenças nas concentrações dos elementos entre os grupos. Com o número de

casos utilizados neste estudo, uma amostra que apresente concentração muito diferente de um determinado elemento é capaz de invalidar estatisticamente uma diferença que possa existir entre os dois grupos.

VI. – CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho mostram que:

- 1) A degeneração neuronal é evidente no corno anterior da medula espinhal no material de autópsia de portadores de ELA avaliados;
- 2) Os neurônios remanescentes, em sua maioria, apresentam alterações morfológicas evidentes, que se caracterizaram por: alterações no tamanho do corpo celular, presença de inclusões no citoplasma neuronal, deslocamento das estruturas intracitoplasmáticas e vacuolização;
- 3) A perda neuronal na ELA é acompanhada de gliose reacional. Os prolongamentos astrocíticos tornam-se mais numerosos e desorganizados;
- 4) A presença de inclusões positivas para ubiquitina é uma característica da doença e um importante indicativo da participação do sistema ubiquitina na patogênese da ELA;
- 5) O aumento da expressão das subunidades $\alpha\beta$ do proteasoma nos neurônios do corno anterior da medula espinhal dos casos de ELA indica envolvimento deste complexo no processo patogênico da ELA;
- 6) A presença de ubiquitina e proteasoma em alguns astrócitos é indicativo da participação destas células na patogênese da doença;

- 7) O aumento da expressão de ubiquitina e proteasoma indica que esta importante via de degradação está, de alguma forma, envolvida com a neurodegeneração em casos de ELA. Esta via pode participar do processo patogênico de forma direta ou sua desorganização pode ser uma consequência da tentativa de restauração do funcionamento celular;
- 8) A presença de neurofilamento no líquido cefalorraquidiano de portadores de ELA é um importante indicativo do envolvimento desta subunidade no processo patogênico da doença. A evidência desta subunidade em 70% dos casos analisados revela especificidade da proteína e no futuro este tipo de análise talvez possa ser realizada para fins diagnósticos;
- 9) Apesar de observarmos, nos casos de ELA, o aumento de expressão das subunidades $\alpha\beta$ do proteasoma nos neurônios do corno anterior da medula espinhal, não identificamos a presença destas subunidades no líquido cefalorraquidiano dos pacientes portadores da doença;
- 10) Não evidenciamos diferenças na expressão de proteínas contendo resíduos de nitrotirosina entre o grupo controle e o grupo de ELA;
- 11) O perfil protéico do líquido cefalorraquidiano de portadores de ELA e em controles é diferente segundo a análise proteômica;
- 12) As concentrações de cálcio, cloro e potássio estão aumentadas no líquido cefalorraquidiano de portadores de ELA quando comparadas aos casos-controle.

VII. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDI F, QUINN JF, JANKOVIC J, MCINTOSH M, LEVERENZ JB, PESKIND E, NIXON R, NUTT J, CHUNG K, ZABETIAN C, SAMII A, LIN M, HATTAN S, PAN C, WANG Y, JIN J, ZHU D, LI GJ, LIU Y, WAICHUNAS D, MONTINE TJ, ZHANG J. Detection of biomarkers with a multiplex quantitative proteomic platform in cerebrospinal fluid of patients with neurodegenerative disorders. **J Alzheimers Dis.** 9 (3):293-348, 2006.

ACKERLEY S, GRIERSON AJ, BANNER S, PERKINTON MS, BROWNLEES J, BYERS HL, WARD M, THORNHILL P, HUSSAIN K, WABY JS, ANDERTON BH, COOPER JD, DINGWALL C, LEIGH PN, SHAW CE & MILLER CC. p38alpha stress-activated protein kinase phosphorylates neurofilaments and is associated with neurofilament pathology in amyotrophic lateral sclerosis. **Mol Cell Neuroscience.** 26 (2):354-64, 2004.

AHMED N, AHMED U, THORNALLEY PJ, HAGER K, FLEISCHER G, MUNCH G. Protein glycation, oxidation and nitration adduct residues and free adducts of cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease and link to cognitive impairment. **J Neurochem.** 92 (2):255-63, 2005.

ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K & WATSON JD. Molecular Biology of the Cell. **Third edition.** 1993.

ALEXIANU, M E. The role of calcium-binding proteins in selective motorneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. **Ann Neurol.** 36,846-858, 1994.

ALMEIDA CG, TAKAHASHI RH, GOURAS GK. Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. **J Neurosci.** 26 (16):4277-88, 2006.

ALMER G, GUEGAN C, TEISMANN P, NAINI A, ROSOKLIJA G, HAYS AP, CHEN C, PRZEDBORSKI S. Increased expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis. **Ann Neurol.** 49 (2):176-85, 2001.

ALVES-RODRIGUES A, GREGORI L & PEREIRA MEF-. Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration. **Trends Neuroscience.** 21, 516-520, 1998.

ANDERSON CM, SWANSON RA. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. **Glia.** 32 (1):1-14, 2000.

ANDERTON BH, BRION JP, FLAMENT-DURAND J, HAUGH MC, KAHN J, MILLER CC, PROBST A, ULRICH J. Neurofibrillary tangles and the neuronal cytoskeleton. **J Neural Transm.** 24, Suppl: 191-6, 1987.

AQUILONIUS SM, JOSSAN SS, EKBLUM JG, ASKMARK H, GILLBERG PG. Increased binding of 3H-L-deprenyl in spinal cords from patients with amyotrophic lateral sclerosis as demonstrated by autoradiography. **J Neural Transm Gen Sect.** 89 (1-2):111-22, 1992.

ARENDRT CS, HOCHSTRASSER M. Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. **Proc Natl Acad Science.** 94, 7156-7161, 1997.

AULAK KS, KOECK T, CRABB JW, STUEHR DJ. Proteomic method for identification of tyrosine-nitrated proteins. **Methods Mol Biol.** 279: 151-65, 2004.

AZZOUZ M, RALPH GS, STORKEBAUM E, WALMSLEY LE, MITROPHANOUS KA, KINGSMAN SM, CARMELIET P, MAZARAKIS ND. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. **Nature.** 429 (6990):413-7, 2004.

BACMAN SR, BRADLEY WG, MORAES CT. Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis: trigger or target? **Mol Neurobiol.** 33 (2):113-31, 2006.

BAJAJ NPS, AL-SARRAJ ST, LEIGH PN, ANDERSON V, MILLER CCJ. Cyclin Dependent Kinase-5 (CDK-5) phosphorylates neurofilament heavy (NF-H) chain to generate epitopes for antibodies that label neurofilament accumulations in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and is present in affected motor neurones in ALS. **Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat.** 23: 833-850, 1999.

BAJOREK M, FINLEY D, GLICKMAN MH. Proteasome disassembly and downregulation is correlated with viability during stationary phase. **Curr Biol.** 1;13 (13):1140-4, 2003.

BARBEITO LH, PEHAR M, CASSINA P, VARGAS MR, PELUFFO H, VIERA L, ESTEVEZ AG, BECKMAN JS. A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. **Brain Res Rev.** 47 (1-3):263-74, 2004.

BEAL MF, FERRANTE RJ, BROWNE SE, MATTHEWS RT, KOWALL NW, BROWN RH JR. Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. **Ann Neurology.** 42 (4):644-54, 1997.

BEAR, M.F.; CONNORS, BARRY W. E PARADISO, MICHAEL. Neuroscience: Exploring the Brain. **Editora Williams & Wilkins,** 20001.

BECKMAN JS, ISCHIROPOULOS H, ZHU L, VAN DER WOERD M, SMITH C, CHEN J, HARRISON J, MARTIN JC, TSAI M. Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. **Arch Biochem Biophys.** 298 (2):438-45, 1992.

BELLEROCHE J, RECORDATI A, ROSE FC. Elevated levels of amino acids in the CSF of motor neuron disease patients. **Neurochem Pathol.** 2 (1):1-6, 1984.

BENARROCH EE. Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. **Mayo Clin Proc.** 80 (10):1326-38, 2005.

BENDOTTI C, CALVARESI N, CHIVERI L, PRELLE A, MOGGIO M, BRAGA M, SILANI V, DE BIASI S. Early vacuolization and mitochondrial damage in motor neurons of FALS mice

are not associated with apoptosis or with changes in cytochrome oxidase histochemical reactivity. **J Neurol Sci.** 191 (1-2):25-33, 2001.

BERTONI-FREDDARI C, MOCCHEGIANI E, MALAVOLTA M, CASOLI T, DI STEFANO G, FATTORETTI P. Synaptic and mitochondrial physiopathologic changes in the aging nervous system and the role of zinc ion homeostasis. **Mech Ageing Dev.** 127 (6):590-6, 2006.

BOHIC S, WEISS P, ROGER P, DACULSI G. Light scattering experiments on aqueous solutions of selected cellulose ethers: contribution to the study of polymer-mineral interactions in a new injectable biomaterial. **J Mater Sci Mater Med.** 12 (3):201-5, 2001.

BOHIC S., A. SIMIONOVIC, R. /ORTEGA, D. HEYMANN, C. SCHROER, A. SNIGIREV. **Nucl. Instr Meth.** 181, 2001.

BOILLEE S, YAMANAKA K, LOBSIGER CS, COPELAND NG, JENKINS NA, KASSIOTIS G, KOLLIAS G, CLEVELAND DW. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. **Science.** 312 (5778): 1389-92, 2006.

BOWLING AC, SCHULZ JB, BROWN RH JR, BEAL MF. Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurochem.** 61 (6):2322-5, 1993.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254, 1976.

BREDESEN DE, PAZOS W-, GOTO JJ, RABIZADEH S, ROE JA, GRALLA EB, ELLERBY LM & VALENTINE JS. Cell death mechanisms in ALS. **Neurology.** 47 (Suppl 2), S36-S39, 1996.

BRETTSCHEIDER J, PETZOLD A, SCHOTTLE D, CLAUS A, RIEPE M, TUMANI H. The neurofilament heavy chain (NfH) in the cerebrospinal fluid diagnosis of Alzheimer's disease. **Dement Geriatr Cogn Disord.** 21 (5-6):291-5, 2006.

BRETTSCHEIDER J, PETZOLD A, SUSSMUTH SD, LUDOLPH AC, TUMANI H. Axonal damage markers in cerebrospinal fluid are increased in ALS. **Neurology.** 66 (6):852-6, 2006.

BROOKS BR, MILLER RG, SWASH M, MUNSAT TL, WORLD FEDERATION OF NEUROLOGY RESEARCH GROUP ON MOTOR NEURON DISEASES. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. **Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.** 1 (5): 293-9, 2000.

BROOKS BR. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. **J Neurol Science.** 124 Suppl:96-107, 1994.

- BROWNELL B, OPPENHEIMER DR, HUGHES JT. The central nervous system in motor neuron disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. 33: 338-357, 1970.
- BRUIJN LI, BEAL MF, BECHER MW, SCHULZ JB, WONG PC, PRICE DL, CLEVELAND DW. Elevated free nitrotyrosine levels, but not protein-bound nitrotyrosine or hydroxyl radicals, throughout amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-like disease implicate tyrosine nitration as an aberrant in vivo property of one familial ALS-linked superoxide dismutase 1 mutant. **Proc Natl Acad Sci USA**. 94 (14): 7606-11, 1997.
- BRUIJN LI, MILLER TM & CLEVELAND DW. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. **Annu Rev Neuroscience**. 27, 723-49, 2004.
- BUSH AI. Metals and neuroscience. **Curr Opin Chem Biol**. 4 (2):184-91, 2000.
- CALINGASAN NY, CHEN J, KIAEI M, BEAL MF. Beta-amyloid 42 accumulation in the lumbar spinal cord motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis patients. **Neurobiol Dis**. 19 (1-2):340-7, 2005.
- CARDEN MJ, TROJANOWSKI JQ, SCHLAEPFER WW & LEE VM. Two-stage expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns. **Neuroscience**. 7 (11): 3489-504, 1987.
- CARPENTER S. Proximal axonal enlargement in motor neuron disease. **Neurology**. 18 (9):841-51, 1968.
- CASSARINO DS, BENNETT JP JR. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. **Brain Res Brain Res Rev**. 29 (1):1-25, 1999.
- CASTANO EM, ROHER AE, ESH CL, KOKJOHN TA, BEACH T. Comparative proteomics of cerebrospinal fluid in neuropathologically-confirmed Alzheimer's disease and non-demented elderly subjects. **Neurol Res**. 28 (2):155-63, 2006.
- CHARCOT JM, JOFFROY A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et des faisceaux antéro-latéraux de la moelle épinière. **Arch Physiol Neurol Path**. 2: 744, 1869.
- CHARCOT JM. De la sclérose latérale amyotrophique. **Prog Med**. 2: 325, 341, 1874.
- CHUNG KKK, DAWSON VL, DAWSON TM. The role of the ubiquitin-proteasomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. **TINS**. 24 (11) Suppl., 2001.
- CHWIEJ J, FIK-MAZGAJ K, SZCZERBOWSKA-BORUCHOWSKA M, LANKOSZ M, OSTACHOWICZ J, ADAMEK D, SIMIONOVICI A, BOHIC S. Classification of nerve cells from substantia nigra of patients with Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis with

the use of X-ray fluorescence microscopy and multivariate methods. **Anal Chem.** 77 (9): 2895-900, 2005.

CIECHANOVER A, SCHWARTZ AL. The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of protein death. **Proc Natl Acad Sci USA.** 95, 2727-2730, 1998.

CLEVELAND DW. From Charcot to SOD1: mechanisms of selective motor neuron death in ALS. **Neuron.** 24 (3):515-20, 1999.

CUDKOWICZ ME, SCHOENFELD D, WILLIAMS L. Improving the responsiveness of rating scales: the challenge of stepping twice into the same river. **Neurology.** 62 (10):1666-7, 2004.

DAMIANO M, STARKOV AA, PETRI S, KIPIANI K, KIAEI M, MATTIAZZI M, FLINT BEAL M, MANFREDI G. Neural mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. **J Neurochem.** 96 (5):1349-61, 2006.

DASHIELL SM, TANNER SL, PANT HC, QUARLES RH. Myelin-associated glycoprotein modulates expression and phosphorylation of neuronal cytoskeletal elements and their associated kinases. **J Neurochem.** 81 (6): 1263-72, 2002.

DEISENHAMMER F, BARTOS A, EGG R, GILHUS NE, GIOVANNONI G, RAUER S, SELLEBJERG F. Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from an EFNS task force. **Eur J Neurol.** 13 (9):913-22, 2006.

DELISLE MB, CARPENTER S. Neurofibrillary axonal swellings and amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurol Sci.** 63 (2):241-50, 1984.

DING Q, KELLER JN. Proteasomes and proteasome inhibition in the central nervous system. **Free Radic Biol Med.** 31 (5):574-84, 2001.

DOMENICONI M, FILBIN MT. Overcoming inhibitors in myelin to promote axonal regeneration. **J Neurol Sci.** 233 (1-2):43-7, 2005.

DREXLER HCA. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. **Proc Natl Acad Sci USA.** 94, 855-860, 1997.

DRISCOLL J, FRUDMAN J, GOLDBERG AL. An ATP-stabilized inhibitor of the proteasome is a component of the 1500-kDa ubiquitin conjugate-degrading complex. **Proc Natl Acad Sci USA.** 89, 4986-4990, 1992.

EDDLESTON M, MUCKE L. Molecular profile of reactive astrocytes-implications for their role in neurologic disease. **Neuroscience.** 54 (1):15-36, 1993.

EKEGREN T, GRUNDSTROM E, LINDHOLM D, AQUILONIUS SM. Upregulation of Bax protein and increased DNA degradation in ALS spinal cord motor neurons. **Acta Neurol Scand.** 100 (5):317-21, 1999.

ELLISON D, LOVE S, CHIMELLI L, HARDING B, LOWE J, ROBERTS GW, VINTERS HV. Neuropathology. **Third edition**. 1998.

FERRANTE RJ, BROWNE SE, SHINOBU LA, BOWLING AC, BAIK MJ, MACGARVEY U, KOWALL NW, BROWN RH JR, BEAL MF. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurochem**. 69 (5):2064-74, 1997.

FIGLEWICZ DA, GARRUTO RM, KRIZUS A, YANAGIHARA R, ROULEAU GA. The Cu/Zn superoxide dismutase gene in ALS and parkinsonism-dementia of Guam. **Neuroreport**. 5 (5):557-60, 1994.

FIGLEWICZ DA, KRIZUS A, MARTINOLI MG, MEININGER V, DIB M, ROULEAU GA, JULIEN JP. Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. **Hum Mol Genet**. 3 (10): 1757-61, 1994.

FRIEDLANDER RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. **N Engl J Med**. 348 (14): 1365-75, 2003.

FUCHS E, HANUKOGLU I. Unraveling the structure of the intermediate filaments. **Cell**. 34 (2): 332-4, 1983.

GAJDUSEK DC, SALAZAR AM. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonian syndromes in high incidence among the Auyu and Jakai people of West New Guinea. **Neurology**. 32 (2):107-26, 1982.

GARCIA ML, LOBSIGER CS, SHAH SB, DEERINCK TJ, CRUM J, YOUNG D, WARD CM, CRAWFORD TO, GOTOW T, UCHIYAMA Y, ELLISMAN MH, CALCUTT NA, CLEVELAND DW. NF-M is an essential target for the myelin-directed "outside-in" signaling cascade that mediates radial axonal growth. **J Cell Biol**. 163 (5):1011-20, 2003.

GIASSON BI, MUSHYNSKI WE. Aberrant stress-induced phosphorylation of perikaryal neurofilaments. **J Biol Chem**. 271 (48): 30404-9, 1996.

GLICKMAN MH, RAVEH D. Proteasome plasticity. **FEBS Lett**. 579 (15): 3214-23, 2005.

GREENACRE SA, ISCHIROPOULOS H. Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. **Free Radic Res**. 34 (6): 541-81, 2001.

GUEGAN C, VILA M, ROSOKLIJA G, HAYS AP, PRZEDBORSKI S. Recruitment of the mitochondrial-dependent apoptotic pathway in amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurosci**. 21 (17): 6569-76, 2001.

GURNEY ME, PU H, CHIU AY, DAL CANTO MC, POLCHOW CY, ALEXANDER DD, CALIENDO J, HENTATI A, KWON YW, DENG HX. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. **Science**. 264 (5166): 1772-5, 1994.

GUTMANN L, MITSUMOTO H. Advances in ALS. **Neurology**. 47, Suppl: 17-8, 1996.

- HADANO S, HAND CK, OSUGA H, YANAGISAWA Y, OTOMO A, DEVON RS, MIYAMOTO N, SHOWGUCHI-MIYATA J, OKADA Y, SINGARAJA R, FIGLEWICZ DA, KWIATKOWSKI T, HOSLER BA, SAGIE T, SKAUG J, NASIR J, BROWN RH JR, SCHERER SW, ROULEAU GA, HAYDEN MR, IKEDA JE. A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. **Nat Genet.** 29 (2): 166-73, 2001.
- HALL ED, ANDRUS PK, OOSTVEEN JA, FLECK TJ, GURNEY ME. Relationship of oxygen radical-induced lipid peroxidative damage to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. **J Neurosci Res.** 53 (1): 66-77, 1998.
- HARRIS J, AYYUB C, SHAW G. A molecular dissection of the carboxyterminal tails of the major neurofilament subunits NF-M and NF-H. **J Neurosci Res.** 30 (1):47-62, 1991.
- HE CZ, HAYS AP. Expression of peripherin in ubiquitinated inclusions of amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurol Sci.** 217 (1):47-54, 2004.
- HEDREEN JC, KOLIATSOS VE. Phosphorylated neurofilaments in neuronal perikarya and dendrites in human brain following axonal damage. **J Neuropathol Exp Neurol.** 53 (6):663-71, 1994.
- HEINS S, WONG PC, MULLER S, GOLDIE K, CLEVELAND DW, AEBI U. The rod domain of NF-L determines neurofilament architecture, whereas the end domains specify filament assembly and network formation. **J Cell Biol.** 123: 1517-33, 1993.
- HERSHKO A, CIECHANOVER A. The ubiquitin system. **Annu Rev Biochem.** 67: 425-79, 1998.
- HIRANO A. Cytopathology of amyotrophic lateral sclerosis. **Adv Neurol.** 56: 91-101, 1991.
- HIRANO, A. Neuropathology of ALS: an overview. **Neurology.** 47, Suppl 2: 63-66, 1996.
- HIROKAWA N, GLICKSMAN MA, WILLARD MB. Organization of mammalian neurofilament polypeptides within the neuronal cytoskeleton. **J Cell Biol.** 98 (4): 1523-36, 1984.
- HOFFMAN PN, GRIFFIN JW, PRICE DL. Control of axonal caliber by neurofilament transport. **J Cell Biol.** 99 (2):705-14, 1984.
- HOFFMAN PN, LASEK RJ. The slow component of axonal transport. Identification of major structural polypeptides of the axon and their generality among mammalian neurons. **J Cell Biol.** 66 (2):351-66, 1975.
- IMAI J, MARUYA M, YASHIRODA H, YAHARA I, TANAKA K. The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome. **EMBO J.** 22 (14): 3557-67, 2003.

JULIEN JP, MILLECAMPS S, KRIZ J. Cytoskeletal defects in amyotrophic lateral sclerosis (motor neuron disease). **Novartis Found Symp.** 264: 183-92, 2005.

JULIEN JP, MUSHYNSKI WE. Multiple phosphorylation sites in mammalian neurofilament polypeptides. **J Biol Chem.** 257 (17): 10467-70, 1982.

JULIEN JP. Amyotrophic lateral sclerosis: unfolding the toxicity of the misfolded. **Cell.** 104 (4): 581-91, 2001.

JULIEN, J-P. Neurofilament functions in health and disease. **Cur Opin Neurobiol.** 9, 554-560, 1999.

KISHI R, IKEDA T, MIYAKE H, UCHINO E, TSUZUKI T, INOUE K. Regional distribution of lead, zinc, iron and copper in suckling and adult rat brains. **Brain Res.** 251 (1): 180-2, 1982.

KITADA T, ASAKAWA S, HATTORI N, MATSUMINE H, YAMAMURA Y, MINOSHIMA S, YOKOCHI M, MIZUNO Y, SHIMIZU N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. **Nature.** 392 (6676): 605-8, 1998.

KLIVENYI P, ANDREASSEN OA, FERRANTE RJ, DEDEOGLU A, MUELLER G, LANCELOT E, BOGDANOV M, ANDERSEN JK, JIANG D, BEAL MF. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase show increased vulnerability to malonate, 3-nitropropionic acid, and 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. **J Neurosci.** 20 (1): 1-7, 2000.

KONG J, XU Z. Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. **J Neurosci.** 18 (9): 3241-50, 1998.

KRIZ J, GOWING G, JULIEN JP. Efficient three-drug cocktail for disease induced by mutant superoxide dismutase. **Ann Neurol.** 53 (4): 429-36, 2003.

KUSHNER PD, STEPHENSON DT, WRIGHT S. Reactive astrogliosis in the subcortical white matter of amyotrophic lateral sclerosis. **J Neuropathol Exp Neurol.** 50:263-277, 1991.

LACOMBLEZ L, BENSIMON G, LEIGH PN, GUILLET P, MEININGER V. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. **Lancet.** 347 (9013): 1425-31, 1996.

LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227 (5259): 680-5, 1970.

LAM YA, PICKART CM, ALBAN A, LANDON M, JAMIESON C, RAMAGE R, MAYER RJ, LAYFIELD R. Inhibition of ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. **PNAS.** 97, 9902-9906, 2000.

LARIVIERE RC, JULIEN JP. Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. **J Neurobiol.** 58 (1): 131-48, 2004.

- LARSEN CN, KRANTZ BA, WILKINSON KD. Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin C-terminal hydrolases. **Biochemistry**. 37 (10): 3358-68, 1998.
- LAYFIELD R, ALBAN A, MAYER RJ, LOWE J. The ubiquitin protein catabolic disorders. **Neuropathol Appl Neurobiol**. 27 (3):171-9, 2001.
- LAYFIELD R. Does an inhibition of the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation underlie the pathogenesis of non-familial Alzheimer's disease? **Med Hypotheses**. 56 (3):395-9, 2001.
- LEE MK, CLEVELAND DW. Neuronal intermediate filaments. **Annu Rev Neurosc**. 19, 187-217, 1996.
- LEIGH PN, MELDRUM BS. Excitotoxicity in ALS. **Neurology**. 47, Suppl 2: 221-227, 1996.
- LEIGH PN, WHITWELL H, GAROFALO O, BULLER J, SWASH M, MARTIN JE, GALLO J-M, WELLER RO, ANDERTON BH. Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Brain**. 114, 775-788, 1991.
- LOUVEL E, HUGON J, DOBLE A. Therapeutic advances in amyotrophic lateral sclerosis. **TIPS**. 18, 196-202, 1997.
- MANFREDI G, XU Z. Mitochondrial dysfunction and its role in motor neuron degeneration in ALS. **Mitochondrion**. 5 (2): 77-87, 2005.
- MATHER K, WATTS FZ, CARROLL M, WHITEHEAD P, SWASH M, CAIRN N, BURKE J. Antibody to an abnormal protein in amyotrophic lateral sclerosis identifies Lewy body-like inclusions in ALS and Lewy bodies in Parkinson's disease. **Neurosci Lett**. 160 (1):13-6, 1993.
- MCGEER PL, KAWAMATA T, WALKER DG, AKIYAMA H, TOOYAMA I, MCGEER EG. Microglia in degenerative neurological disease. **Glia**. 7(1): 84-92, 1993.
- MENDONCA DM, CHIMELLI L, MARTINEZ AM. Expression of ubiquitin and proteasome in motoneurons and astrocytes of spinal cords from patients with amyotrophic lateral sclerosis. **Neurosci Lett**. 404 (3): 315-9, 2006.
- MENDONCA DM, CHIMELLI L, MARTINEZ AM. Quantitative evidence for neurofilament heavy subunit aggregation in motor neurons of spinal cords of patients with amyotrophic lateral sclerosis. **Braz J Med Biol Res**. 38 (6): 925-33, 2005.
- MENZIES FM, COOKSON MR, TAYLOR RW, TURNBULL DM, CHRZANOWSKA-LIGHTOWLERS ZM, DONG L, FIGLEWICZ DA, SHAW PJ. Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. **Brain**. 125: 1522-33, 2002.
- MIGHELI A, ATTANASIO A, SCHIFFER D. Ubiquitin and neurofilament expression in anterior horn cells in amyotrophic lateral sclerosis: possible clues to the pathogenesis. **Neuropathol Appl Neurobiol**. 20 (3): 282-9, 1994.

MILLER RG, BRYAN WW, DIETZ MA, MUNSAT TL, PETAJAN JH, SMITH SA, GOODPASTURE JC. Toxicity and tolerability of recombinant human ciliary neurotrophic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **Neurology**. 47 (5): 1329-31, 1996.

MU X, HE J, ANDERSON DW, TROJANOWSKI JQ, SPRINGER JE. Altered expression of bcl-2 and bax mRNA in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord motor neurons. **Ann Neurol**. 40 (3): 379-86, 1996.

NAPOLITANO EW, CHIN SS, COLMAN DR, LIEM RK. Complete amino acid sequence and in vitro expression of rat NF-M, the middle molecular weight neurofilament protein. **J Neurosci**. 7 (8): 2590-9, 1987.

NIXON RA, SIHAG RK. Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function. **Trends Neurosci**. 14 (11):501-6, 1991.

OOSTHUYSE B, MOONS L, STORKEBAUM E, BECK H, NUYENS D, BRUSSELMANS K, VAN DORPE J, HELLINGS P, GORSELINK M, HEYMANS S, THEILMEIER G, DEWERCHIN M, LAUDENBACH V, VERMYLEN P, RAAT H, ACKER T, VLEMINCKX V, VAN DEN BOSCH L, CASHMAN N, FUJISAWA H, DROST MR, SCIOT R, BRUYNINCKX F, HICKLIN DJ, INCE C, GRESSENS P, LUPU F, PLATE KH, ROBBERECHT W, HERBERT JM, COLLEN D, CARMELIET P. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. **Nat Genet**. 28 (2): 131-8, 2001.

PAN B, FROMHOLT SE, HESS EJ, CRAWFORD TO, GRIFFIN JW, SHEIKH KA, SCHNAAR RL. Myelin-associated glycoprotein and complementary axonal ligands, gangliosides, mediate axon stability in the CNS and PNS: neuropathology and behavioral deficits in single- and double-null mice. **Exp Neurol**. 195 (1): 208-17, 2005.

PASINELLI P, BROWN RH. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. **Nat Rev Neurosci**. 7(9): 710-23, 2006.

PASINELLI P, BELFORD ME, LENNON N, BACSKAI BJ, HYMAN BT, TROTTI D, BROWN RH JR. Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. **Neuron**. 8; 43 (1): 19-30, 2004.

PASINELLI P, HOUSEWEART MK, BROWN RH JR, CLEVELAND DW. Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. **Proc Natl Acad Sci USA**. 97 (25):13901-6, 2000.

PLUMMER J, PETERSON A, MESSER A. Accelerated and widespread neuronal loss occurs in motor neuron degeneration (mnd) mice expressing a neurofilament-disrupting transgene. **Mol Cell Neurosci**. 6 (6): 532-43, 1995.

PRADAT PF, BRUNETEAU G. Differential diagnosis and atypical subsets of ALS. **Rev Neurol (Paris)**. 162 (2): 4S81-4S90, 2006.

RAKHIT R, CUNNINGHAM P, FURTOS-MATEI A, DAHAN S, QI XF, CROW JP, CASHMAN NR, KONDEJEWSKI LH, CHAKRABARTTY A. Oxidation-induced misfolding and aggregation of superoxide dismutase and its implications for amyotrophic lateral sclerosis. **J Biol Chem.** 6; 277 (49):47551-6, 2002.

RANGANATHAN S, WILLIAMS E, GANCHEV P, GOPALAKRISHNAN V, LACOMIS D, URBINELLI L, NEWHALL K, CUDKOWICZ ME, BROWN RH JR, BOWSER R. Proteomic profiling of cerebrospinal fluid identifies biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurochem.** 95 (5): 1461-71, 2005.

RIZZARDINI M, LUPI M, MANGOLINI A, BABETTO E, UBEZIO P, CANTONI L. Neurodegeneration induced by complex I inhibition in a cellular model of familial amyotrophic lateral sclerosis. **Brain Res Bull.** 69 (4): 465-74, 2006.

ROSEN DR, SIDDIQUE T, PATTERSON D, FIGLEWICZ DA, SAPP P, HENTATI A, DONALDSON D, GOTO J, O'REGAN JP, DENG HX, ET AL. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. **Nature.** 364 (6435): 362, 1993.

ROSENGREN LE, KARLSSON JE, KARLSSON JO, PERSSON LI, WIKKELSO C. Patients with amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases have increased levels of neurofilament protein in CSF. **J Neurochem.** 67 (5): 2013-8, 1996.

ROSS CA, POIRIER MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. **Nat Med.** 10, Suppl: 10-7, 2004.

ROTHSTEIN JD, DYKES-HOBERG M, PARDO CA, BRISTOL LA, JIN L, KUNCL RW, KANAI Y, HEDIGER MA, WANG Y, SCHIELKE JP, WELTY DF. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. **Neuron.** 16 (3): 675-86, 1996.

ROTHSTEIN JD, TSAI G, KUNCL RW, CLAWSON L, CORNBLATH DR, DRACHMAN DB, PESTRONK A, STAUCH BL, COYLE JT. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. **Ann Neurol.** 28 (1): 18-25, 1990.

ROWLAND, LP, SHNEIDER, NA. Medical Progress: Amyotrophic Lateral Sclerosis. **N Engl J Med.** 344 (22): 1688-1700, 2001.

ROWLAND, LP. What's in a name? Amyotrophic Lateral Sclerosis, motor neuron disease, and allelic heterogeneity. **Ann Neurol.** 43: 691-694; 1998.

SANELLI TR, SOPPER MM, STRONG MJ. Sequestration of nNOS in neurofilamentous aggregate bearing neurons in vitro leads to enhanced NMDA-mediated calcium influx. **Brain Res.** 1004 (1-2):8-17, 2004.

SARGSYAN SA, MONK PN, SHAW PJ. Microglia as potential contributors to motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. **Glia.** 51 (4): 241-53, 2005.

SASAKI S, IWATA M. Immunoreactivity of beta-amyloid precursor protein in amyotrophic lateral sclerosis. **Acta Neuropathol.** 97 (5): 463-8, 1999.

SASAKI S, IWATA M. Impairment of fast axonal transport in the proximal axons of anterior horn neurons in amyotrophic lateral sclerosis. **Neurology.** 47 (2): 535-40, 1996.

SASAKI S, WARITA H, ABE K, IWATA M. Impairment of axonal transport in the axon hillock and the initial segment of anterior horn neurons in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. **Acta Neuropathol (Berl).** 110 (1): 48-56, 2005.

SASAKI S, WARITA H, MURAKAMI T, ABE K, IWATA M. Ultrastructural study of mitochondria in the spinal cord of transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. **Acta Neuropathol (Berl).** 107 (5): 461-74, 2004.

SATOH K, SASAJIMA H, NYOUMURA KI, YOKOSAWA H, SAWADA H. Assembly of the 26S proteasome is regulated by phosphorylation of the p45/Rpt6 ATPase subunit. **Biochemistry.** 40 (2): 314-9, 2001.

SCHACHNER M, BARTSCH U. Multiple functions of the myelin-associated glycoprotein MAG (siglec-4a) in formation and maintenance of myelin. **Glia.** 29 (2): 154-65, 2000.

SCHIFFER D, ATTANASIO A, CHIO A, MIGHELI A, PEZZULO T. Ubiquitinated dystrophic neurites suggest corticospinal derangement in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **Neurosci Lett.** 180 (1): 21-4, 1994.

SCHIFFER D, AUTILIO-GAMBETTI L, CHIO A, GAMBETTI P, GIORDANA MT, GULLOTTA F, MIGHELI A, VIGLIANI MC. Ubiquitin in motor neuron disease: study at the light and electron microscope. **J Neuropathol Exp Neurol.** 50 (4): 463-73, 1991.

SCHIFFER D, CORDERA S, CAVALLA P, MIGHELI A. Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurol Sci.** 139, Suppl: 27-33, 1996.

SCHLAEPFER WW, FREEMAN LA. Neurofilament proteins of rat peripheral nerve and spinal cord. **J Cell Biol.** 78 (3): 653-62, 1978.

SCHOPFER FJ, BAKER PR, FREEMAN BA. NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? **Trends Biochem Sci.** 28 (12): 646-54, 2003.

SEIFERT G, SCHILLING K, STEINHAUSER C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. **Nat Rev Neurosci.** 7 (3): 194-206, 2006.

SEILHEAN D, TAKAHASHI J, EL HACHIMI KH, FUJIGASAKI H, LEBRE AS, BIANCALANA V, DURR A, SALACHAS F, HOGENHUIS J, DE THE H, HAUW JJ, MEININGER V, BRICE A, DUYCKAERTS C. Amyotrophic lateral sclerosis with neuronal intranuclear protein inclusions. **Acta Neuropathol (Berl).** 108 (1): 81-7, 2004.

SEILHEAN D, TAKAHASHI J, EL HACHIMI KH, FUJIGASAKI H, LEBRE AS, BIANCALANA V, DURR A, SALACHAS F, HOGENHUIS J, DE THE H, HAUW JJ, MEININGER V, BRICE A, DUYCKAERTS C. Amyotrophic lateral sclerosis with neuronal intranuclear protein inclusions. **Acta Neuropathol (Berl)**. 108 (1): 81-7, 2004.

SERPA, R. F.B. ; DE JESUS, E.F.O. ; ANJOS, M.J. ; LOPES, R.T. ; MOREIRA, S. ; DO CARMO, M.G.T. ; ROCHA, M. ; MARTINEZ, A.M.B. Elemental concentration in the cortex and hippocampus of Wistar rats by X ray total reflection fluorescence with synchrotron radiation. **J Radioanalytical Nuclear Chem**. 269: 647-652, 2006.

SHAW PJ. Excitotoxicity and motor neurone disease: a review of the evidence. **J Neurol Sci**. 124, Suppl: 6-13, 1994.

SHIBATA N. Transgenic mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase-1 mutation. **Neuropathol**. 21 (1): 82-92, 2001.

SIMPSON EP, YEN AA, APPEL SH. Oxidative Stress: a common denominator in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. **Curr Opin Rheumatol**. 15 (6): 730-6, 2003.

SPREUX-VARQUAUX O, BENSIMON G, LACOMBLEZ L, SALACHAS F, PRADAT PF, LE FORESTIER N, MAROUAN A, DIB M, MEININGER V. Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. **J Neurol Sci**. 193 (2): 73-8, 2002.

STRONG MJ, KESAVAPANY S, PANT HC. The pathobiology of amyotrophic lateral sclerosis: a proteinopathy? **J Neuropathol Exp Neurol**. 64 (8): 649-64, 2005.

STRONG MJ. Amyotrophic lateral sclerosis: contemporary concepts in etiopathogenesis and pharmacotherapy. **Expert Opin Investig Drugs**. 13 (12): 1593-614, 2004.

THORNALLEY PJ, BATTAH S, AHMED N, KARACHALIAS N, AGALOU S, BABAEI-JADIDI R, DAWNAY A. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. **Biochem J**. 375(3): 581-92, 2003.

TOHGI H, ABE T, YAMAZAKI K, MURATA T, ISHIZAKI E, ISOBE C. Remarkable increase in cerebrospinal fluid 3-nitrotyrosine in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **Ann Neurol**. 46 (1): 129-31, 1999.

TU P-H, RAJU P, ROBINSON KA, GURNEY ME, TROJANOWSKI JQ, LEE VM.-Y. Transgenic mice carrying a human mutant superoxide dismutase transgene develop neuronal cytoskeletal pathology resembling human amyotrophic lateral sclerosis lesions. **Proc Natl Acad Sci USA**. 93, 3155-3160, 1996.

VALERA AG, DIAZ-HERNANDEZ M, HERNANDEZ F, ORTEGA Z, LUCAS JJ. The ubiquitin-proteasome system in Huntington's disease. **Neuroscientist**. 11 (6): 583-94, 2005.

VIAL C. What are the clinical criteria of ALS by clinical form? **Rev Neurol (Paris)**. 162 (2): 4S25-4S28, 2006.

VOGES D, ZWICKL P, BAUMEISTER W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. **Annu Rev Biochem**. 68: 1015-68, 1999.

VUKOSAVIC S, STEFANIS L, JACKSON-LEWIS V, GUEGAN C, ROMERO N, CHEN C, DUBOIS-DAUPHIN M, PRZEDBORSKI S. Delaying caspase activation by Bcl-2: A clue to disease retardation in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurosci**. 20 (24): 9119-25, 2000.

WATANABE M, DYKES-HOBERG M, CULOTTA VC, PRICE DL, WONG PC, ROTHSTEIN JD. Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. **Neurobiol Dis**. 8 (6): 933-41, 2001.

WATSON, D. Regional variation in the abundance of axonal cytoskeletal proteins. **J. Neurosc Res**. 30, 226-231, 1991.

YANG W, SOPPER MM, LEYSTRA-LANTZ C, STRONG MJ. Microtubule-associated tau protein positive neuronal and glial inclusions in ALS. **Neurology**. 61 (12): 1766-73, 2003 .

YOSHIDA S, UEBAYASHI Y, KIHIRA T, KOHMOTO J, WAKAYAMA I, TAGUCHI S, YASE Y. Epidemiology of motor neuron disease in the Kii Peninsula of Japan, 1989-1993: active or disappearing focus? **J Neurol Sci**. 155 (2): 146-55, 1998.

ZHANG J, GOODLETT DR, MONTINE TJ. Proteomic biomarker discovery in cerebrospinal fluid for neurodegenerative diseases. **J Alzheimers Dis**. 8 (4):377-86, 2005.

ZWICKL P, BAUMEISTER W. The proteasome-ubiquitin protein degradation pathway. **Curr Topics Microbiol Immunol**. 268, 2002.

VIII. – ANEXOS

Carta de aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética do Instituto de Neurologia Deolindo Couto;

Carta de consentimento livre e esclarecido;

Trabalhos publicados:

Quantitative evidence for neurofilament heavy subunit aggregation in motor neurons of spinal cords of patients with amyotrophic lateral sclerosis. **Braz J Med Biol Res.** 38 (6): 925-33, 2005.

Expression of ubiquitin and proteasome in motorneurons and astrocytes of spinal cords from patients with amyotrophic lateral sclerosis. **Neurosci Lett.** 404 (3): 315-9, 2006.


INSTITUTO DE NEUROLOGIA DEOLINDO COUTO - UFRJ
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA
Projeto 02/ 2003

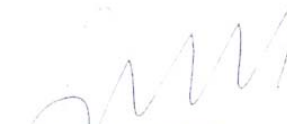
PROJETO : “ANÁLISE DE PROTEÍNAS DE NEUROFILAMENTOS, UBIQUITINA E PROTEASOMA EM PORTADORES DE ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA “

AUTORA : Deise Maria Furtado de Mendonça

PARECER : Projeto aprovado pelo CEP por tratar-se de um protocolo estruturado dentro de normas internacionais de pesquisa que visa investigar a patogênese da doença esclerose lateral amiotrófica (ELA) através do estudo de sangue e líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes portadores da doença ELA, através da análise bioquímica, seqüenciamento genético e microscopia eletrônica onde serão pesquisadas mutações ou alterações nas etapas moleculares da via ubiquitina-proteasoma e das proteínas dos neurofilamentos, além da ultraestrutura do tecido obtido através de autópsia de pacientes que evoluam para o óbito.

O protocolo apresenta uma estruturação científica adequada que consiste num histórico, justificativa do estudo, objetivos do estudo, metodologia, plano de investigação detalhado (desenho do estudo, inagem, população do estudo, termo de consentimento livre e esclarecido do paciente, critérios de inclusão, critérios de elegibilidade) e avaliações e medidas a serem realizados na pesquisa, método de análise de dados e gerenciamento do estudo (coleta de dados, considerações éticas e legais). O projeto se enquadraria plenamente dentro das normas éticas estabelecidas internacionalmente pela Declaração de Helsinque (1964) e suas modificações pela 48ª Associação Médica Mundial como nacionalmente pelo Conselho Nacional de Saúde (CONEP) e Conselho Federal de Medicina (CFM).


DARCY ROBERTO ANDRADE LIMA, Ph.D. (Londres)
Professor Adjunto
Instituto de Neurologia, UFRJ
PRESIDENTE DO CEP


GIANNI TEMPONI
Professor Titular e Diretor Geral
Instituto de Neurologia, UFRJ

ANEXO

Termo de Consentimento para participação na pesquisa

“Análise de proteínas de neurofilamentos, ubiquitina e proteasoma em portadores de esclerose lateral amiotrófica”

Autora: Deise Maria Furtado de Mendonça

Esta pesquisa tem como objetivo investigar a patogênese da doença esclerose lateral amiotrófica, através da análise de **líquido cefalorraquidiano**, por diversas técnicas laboratoriais, como por exemplo, biologia molecular e bioquímica.

O procedimento de retirada do material consiste de uma técnica asséptica meticulosa, no qual o paciente se posicionará em decúbito lateral com sua coluna bem fletida e após anestesia local, uma agulha será introduzida na região lombar a fim de coletar uma amostra de líquido cefalorraquidiano cerebrospinal.

Não há benefício direto para o participante, trata-se de um estudo experimental e somente no final desse estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.

Em qualquer etapa do estudo, o participante poderá ter acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimentos de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Deise Maria Furtado de Mendonça que pode ser encontrada no endereço Av. Marechal Tropicowisky s/ nº, cidade universitária, ilha do fundão, rio de janeiro e no telefone 2562-6431/91267547.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo a continuidade de seu tratamento na instituição.

O material obtido será analisado em conjunto com de outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

O participante tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa, quando em estudos abertos ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Não há despesas para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada a sua participação.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações contidas neste termo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados.

Eu, _____, portador da identidade nº _____, concordo voluntariamente em participar desse estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ___/___/___

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Deise Maria Furtado de Mendonça
Responsável pela pesquisa

Data ___/___/___

ANEXO

Termo de Consentimento para participação na pesquisa

“Análise de proteínas de neurofilamentos, ubiquitina e proteasoma em portadores de esclerose lateral amiotrófica”

Autora: Deise Maria Furtado de Mendonça

Esta pesquisa tem como objetivo investigar a patogênese da doença esclerose lateral amiotrófica, através da análise de **sangue**, por diversas técnicas laboratoriais, como por exemplo, biologia molecular e bioquímica.

A coleta de sangue será realizada por punção periférica na veia do antebraço.

Não há benefício direto para o participante, trata-se de um estudo experimental e somente no final desse estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.

Em qualquer etapa do estudo, o participante poderá ter acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimentos de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Deise Maria Furtado de Mendonça que pode ser encontrada no endereço Av. Marechal Tropicowisky s/ nº, cidade universitária, ilha do fundão, rio de janeiro e no telefone 2562-6431/91267547.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo a continuidade de seu tratamento na instituição.

O material obtido será analisado em conjunto com de outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

O participante tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa, quando em estudos abertos ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Não há despesas para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada a sua participação.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações contidas neste termo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados.

Eu, _____, portador da identidade nº _____, concordo voluntariamente em participar desse estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ___/___/___

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Deise Maria Furtado de Mendonça
Responsável pela pesquisa

Data ___/___/___

Quantitative evidence for neurofilament heavy subunit aggregation in motor neurons of spinal cords of patients with amyotrophic lateral sclerosis

D.M.F. Mendonça^{1,2},
L. Chimelli² and
A.M.B. Martinez¹

¹Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas,
²Serviço de Anatomia Patológica, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho,
Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a neurodegenerative disease of unknown etiology, affects motor neurons leading to atrophy of skeletal muscles, paralysis and death. There is evidence for the accumulation of neurofilaments (NF) in motor neurons of the spinal cord in ALS cases. NF are major structural elements of the neuronal cytoskeleton. They play an important role in cell architecture and differentiation and in the determination and maintenance of fiber caliber. They are composed of three different polypeptides: light (NF-L), medium (NF-M) and heavy (NF-H) subunits. In the present study, we performed a morphological and quantitative immunohistochemical analysis to evaluate the accumulation of NF and the presence of each subunit in control and ALS cases. Spinal cords from patients without neurological disease and from ALS patients were obtained at autopsy. In all ALS cases there was a marked loss of motor neurons, besides atrophic neurons and preserved neurons with cytoplasmic inclusions, and extensive gliosis. In control cases, the immunoreaction in the cytoplasm of neurons was weak for phosphorylated NF-H, strong for NF-M and weak for NF-L. In ALS cases, anterior horn neurons showed intense immunoreactivity in focal regions of neuronal perikarya for all subunits, although the difference in the integrated optical density was statistically significant only for NF-H. Furthermore, we also observed dilated axons (spheroids), which were immunopositive for NF-H but negative for NF-M and NF-L. In conclusion, we present qualitative and quantitative evidence of NF-H subunit accumulation in neuronal perikarya and spheroids, which suggests a possible role of this subunit in the pathogenesis of ALS.

Key words

- Amyotrophic lateral sclerosis
- Spheroids
- Neurofilament proteins
- Immunohistochemistry

Correspondence

A.M.B. Martinez
Departamento de Histologia e
Embriologia, ICB, CCS, UFRJ
Av. Bríg. Trompowsky, s/n, Bl. F
21941-540 Rio de Janeiro, RJ
Brasil
E-mail: martinez@ufrj.br

Research supported by FAPERJ,
CNPq, CAPES, and FUIJB.

Received July 29, 2004
Accepted March 2, 2005

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease of unknown etiology characterized by the loss

of large motor neurons of the spinal cord, brain stem and motor cortex (1-3). The common clinical symptom of this disease is progressive failure of motor neurons that leads to muscle atrophy, paralysis and death,

usually from respiratory failure (4,5), within 2 to 5 years. Up to 50% of motor neurons may have already degenerated before clinical signs appear. Sensory and cognitive functions are not affected and certain motor neuron groups, including those in the oculomotor and Onuf's nuclei, are also spared (6). The diagnosis is based on the clinical symptoms and/or neuropathologic findings (7). ALS cases can be both sporadic and familial. Five to ten percent of all ALS patients show a family history, and approximately 20% of them (1-2% of all ALS cases) have a causative mutation of the Cu/Zn superoxide dismutase gene (8,9).

Among the pathologic signs of ALS, hyaline inclusions, ubiquitin positivity and neurofilament (NF) accumulations are prominent features. NF deposits in degenerating motor neurons are considered to be an early pathological hallmark of this disease. These deposits usually involve the anterior horn neurons, both in the soma and in the axonal process. These focal enlargements of neuronal processes, called spheroids, are pale and present crinkled edges when stained with hematoxylin and eosin (10).

NF are major structural elements of the neuronal cytoskeleton (11) where they play an important role in cell architecture and differentiation, and in the determination and maintenance of fiber caliber (12). They belong to type IV intermediate filaments and are composed of three different polypeptides: light (NF-L), medium (NF-M) and heavy (NF-H) subunits (13,14). Each NF subunit has a 310-amino acid, α -helical rod domain following a ~100-residue head domain, and differences in size are primarily due to the length of the carboxyterminal tail sequences (KSP repeats), which in NF-M and NF-H contain an abundance of charged residues, lysine and glutamic acid, along with numerous serine phosphates (4,15,16). These regions are potential phosphorylation sites (17). Immunohistochemical experiments suggest that the tail domains of NF-M and NF-H are

mostly involved in the formation of cross-bridges (12,18). NF-H and NF-M subunits are found in the phosphorylated state in normal axons and in the non-phosphorylated state in normal soma and dendrites (19,20).

NF have long been assigned a role in the pathogenesis of several types of neurodegenerative disease, including ALS (4). The abundance of NF in motor neurons may be a natural risk factor for the vulnerability of the motor neurons in ALS (21). In the present study, we performed a morphological and quantitative immunohistochemical analysis to evaluate the presence of each subunit - light, medium and high - in spinal cord cell bodies of control and ALS cases and in spheroids of ALS cases.

Material and Methods

Spinal cords were obtained at autopsy from 3 sporadic ALS patients and from 5 patients without neurological disease (controls). The control patients suffered from one of the following diseases: hypertensive cardiopathy (N = 1), aortic aneurysm (N = 1), acute myocardial infarction (N = 1), and acute respiratory failure (N = 2). The average post-mortem time was 4 h both in ALS and control cases. The time of fixation was about two weeks. The summary of ALS cases is shown in Table 1. Formalin-fixed, 5- μ m paraffin-embedded tissue sections from cervical, thoracic, lumbar, and sacral levels were obtained and collected on gelatin-coated glass slides and stained with hematoxylin-eosin and luxol fast blue for morphological analysis, or immunostained with the antibodies. ALS cases were then tested for ubiquitin and all were found to be positive. Sections were observed and photographed with a Zeiss Axioskop 2 plus Microscope.

Immunohistochemistry

Tissue sections were incubated with 3% hydrogen peroxide in distilled water for 20

min to block the endogenous peroxidase and then washed three times (5 min each) in PBS containing 0.3% Triton. After incubation for 1 h with 10% normal goat serum in PBS-0.3% Triton, the sections were microwave treated (1 min, twice) in order to expose hidden epitopes and then reacted with a primary antibody overnight at 4°C. We used the following primary antibodies: anti-NF-H phosphorylated (clone NE14 - 1:40), anti-NF-M (clone NN18 - 1:40), and anti-NF-L (clone NR4 - 1:200), all from Sigma (St. Louis, MO, USA). Sections were then incubated with the corresponding biotinylated secondary antibody at a 1/200 dilution (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 2 h. After reaction with the avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain ABC Kit, Vector), immunoreactivity was visualized by 5-min exposure to 3,3'-diaminobenzidine/H₂O₂. Primary antibodies were omitted for negative controls. Hematoxylin was used for nuclear staining. Sections were dehydrated in a graded alcohol series, cleared in xylene and coverslipped under permount.

Quantitative analysis

The immunostaining intensity of NF from ALS and control cases was determined and the material was submitted to careful light microscopic examination for morphological analysis. Thereafter, cell bodies and spheroids were analyzed quantitatively. It is important to emphasize that immunohistochemistry was performed at the same time for all sections used in the quantitative study. Two or three sections of each spinal cord level were used for all ALS and control cases. All neuronal cell bodies found in both anterior horn areas were sampled and all the structures identified as spheroids were also analyzed. The images obtained were captured on an image analysis system and analyzed with the Image Pro Plus software (Media Cybernetics, Baltimore, MD, USA). NF immunostaining was compared quantitatively be-

tween ALS and control cases. Because some atrophic neurons exhibited a stronger reaction when compared to normal-sized neurons we evaluated the integrated optical density, which represents the mean optical density multiplied by cell area. "Integrated" refers to the integration, or sum, over a given region, of all the pixel intensity or density values (22). Higher values in the bars represent weaker staining and vice-versa. Statistical analysis was performed by the Mann-Whitney test using the Prism software (GraphPad Inc.), with the level of significance set at $P < 0.05$.

Results

In the present study, we used hematoxylin and eosin to identify the general morphologic aspects of ALS cases and immunohistochemistry to characterize, both qualitatively and quantitatively, the distribution of NF subunits in ALS and control cases, observing each subunit individually.

The normal appearance of motor neurons in the anterior horn of the spinal cord from control cases stained with hematoxylin and eosin can be seen in Figure 1a. The Nissl stain is well distributed throughout the perikarya. The nucleus, when observed, is centrally located. It is possible to observe glial cell nuclei that are lightly stained with hematoxylin. In ALS cases, loss of motor neurons is clearly observed. The remaining preserved neurons presented inclusion bodies with intracytoplasmic organelle displacement (Figure 1b). There was also extensive gliosis

Table 1. Data regarding the amyotrophic lateral sclerosis cases studied.

Sex	Age at death	Survival time after diagnosis of the disease	Family history
M	65	9 months	Negative
M	44	1 year and 6 months	Negative
M	62	1 year and 5 months	Negative

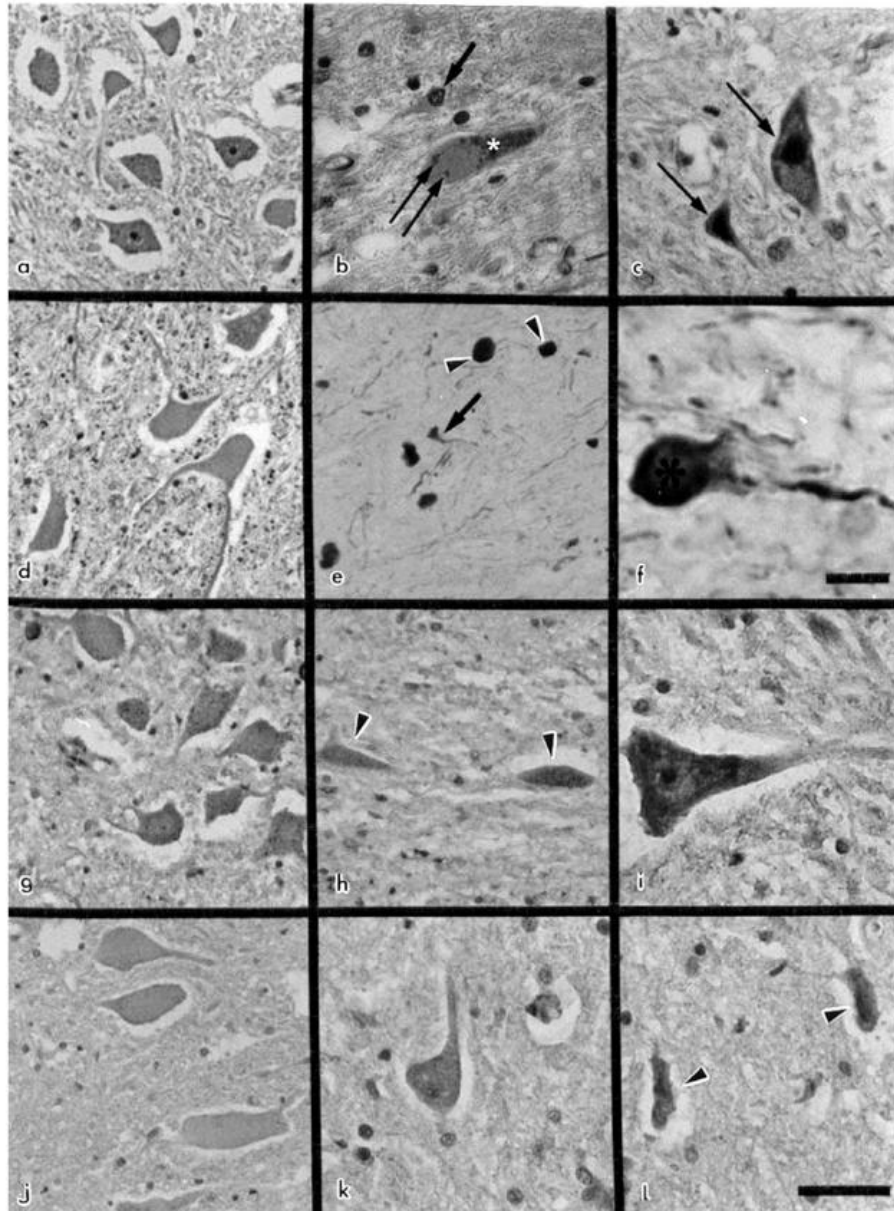


Figure 1. a-c, H&E staining of ventral horn motor neurons. a, Normal aspect of motor neurons in a control case. All motor neurons display Nissl's stain regularly distributed throughout the perikarya; the nucleus, when observed, is centrally located and glial cell nuclei are lightly stained with hematoxylin. b,c, Motor neurons from amyotrophic lateral sclerosis (ALS) cases. b, Motor neuron with intracytoplasmic inclusions (arrows) and Nissl stain displacement (asterisk). Reactive gliosis is also observed (thick arrow). c, Atrophic neuron (arrows). d-f, Immunohistochemistry for neurofilaments. d-f, Immunohistochemistry for neurofilament heavy subunit (phosphorylated form). d, Control case exhibiting weak and equally distributed reaction in the perikarya. e, ALS atrophic neuron presenting strong immunostaining (arrow) and spheroids are also observed (arrowheads). f, ALS neuronal fragment displaying strong immunostaining (asterisk). g-j, Immunohistochemistry for neurofilament medium subunit. g, Motor neurons of a control case exhibiting a strong and uniform immunostaining. h, Atrophic neurons presenting stronger immunoreaction (arrowheads). i, Motor neuron with strong immunoreaction in perikarya. j, Immunohistochemistry for neurofilament light subunit. j, In control cases the immunoreactivity appears mild and distributed throughout the cytoplasm of motor neurons. k, ALS neuron with early morphological alteration exhibiting stronger immunoreaction when compared to control. l, Atrophic neurons presenting strong immunoreaction (arrowheads). Scale bar: (a, b, c, d, e, h, i, k, l) 35 μ m; (g, j) 70 μ m; (f) 10 μ m.

characterized by increased numbers of nuclei and enlargement of cytoplasmic processes (Figure 1b). Some atrophic neurons were also noted (Figure 1c). Neuronal loss was observed at all spinal levels. The lateral corticospinal tract was pale and showed extensive gliosis.

Immunohistochemistry for all tested NF subunits was positive in cell bodies and neurites of controls and in preserved neurons of ALS cases. However, the amount of labeling was different according to the specific subunit and cell region. Immunoreactivity was distributed throughout the cytoplasm and extended into neuronal processes; however, in control cases, cell bodies with the most intense label were those reacting for the NF-M subunit. The axoplasm in the white matter was strongly labeled for most antibodies, except for the NF-L subunit, whose immunoreaction was relatively weak.

Immunohistochemistry for NF-H (phosphorylated form only)

In control cases, the immunoreactivity for the phosphorylated form of NF-H was weak and equally distributed throughout the perikarya (Figure 1d). However, in the axoplasm of white matter the immunoreactivity was very strong. In ALS cases, some remaining cells presented immunoreactivity

similar to control cases, but others presented focal areas of intense staining, indicating an accumulation of the tested subunit in these regions. Atrophic neurons and spheroids were also seen in the ventral horns and showed strong immunostaining (Figure 1e). Structures appearing to be neuronal fragments also showed strong immunostaining (Figure 1f). Spheroids were distinguished from atrophic and fragmented neurons by their rounded appearance and also due to the fact that neurons are not usually rounded and 1 or 2 processes can be seen arising from their cell bodies.

Immunohistochemistry for NF-M

The antibody to the NF-M epitope labeled neurons in a strong and uniform pattern in control cases (Figure 1g) and the same was observed in white matter axons. In ALS cases, atrophic neurons usually presented a strong immunoreaction when compared to other groups of neurons (Figure 1h). Remaining neurons usually exhibited the same immunoreaction as controls, but some neurons were strongly stained (Figure 1i). Spheroids were negative for this subunit.

Immunohistochemistry for NF-L

In control cases, the immunoreactivity

was mild when compared to the other subunits and regularly distributed throughout the cytoplasm of motor neurons (Figure 1j). Axons in the white matter presented various degrees of staining; some were weakly stained and others were strongly labeled. In ALS cases, immunoreaction seemed to be more intense in preserved neurons and in neurons with early morphological alterations (Figure 1k), as well as in atrophic neurons (Figure 1l). Similar to NF-M, spheroids did not stain with NF-L.

Quantitative analysis

Although immunoreactivity for all antibodies used seemed to be more intense in

collections of motor neurons from ALS cases when visualized by light microscopy, quantitative analysis revealed that this immunoreactivity was significantly increased only for the NF-H subunit phosphorylated form (Figure 2A). However, for NF-M (Figure 2B) and NF-L (Figure 2C) this increase was not significant.

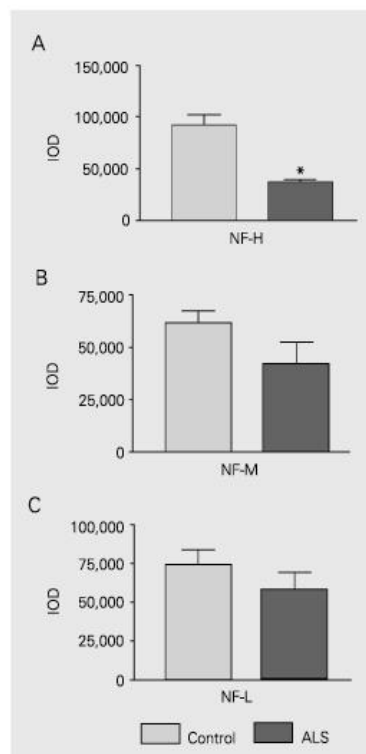
Spheroids were only positive for NF-H. When we compared immunostaining between spheroids and cell bodies, we observed that they both showed strong immunoreaction with no statistically significant difference (Figure 3).

Discussion

ALS is a neurodegenerative disease that has been the subject of many studies focusing on different aspects of this disorder. However, the pathogenesis of the disease is still unresolved. An important feature of the pathogenesis of ALS is the presence of NF accumulations in degenerating neurons. The results of the present study show the neuropathological signs of ALS cases and the presence, localization and quantitative distribution of the three NF subunits - NF-L, NF-M and NF-H in control and ALS cases. We also investigated the presence of NFs in swollen axonal processes (spheroids). To our knowledge, our results represent the first quantitative analysis of all different NF subunits in ALS cases, both in cell bodies and spheroids.

In control cases, immunohistochemistry revealed an intense immunoreaction for antibodies against NF-M epitopes in neuronal perikarya. NF-H in its phosphorylated form presented the lightest staining in the perikarya. Both subunits, however, presented a strong staining in neuronal processes. These data are consistent with the fact that the phosphorylated form of NF subunits is mainly located in the axoplasm, while the non-phosphorylated form is found preferentially in the neuronal perikarya and dendrites

Figure 2. Quantification of immunostaining intensity in cell bodies of control and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) cases for all antibodies studied. IOD = integrated optical density. Higher values in the bars represent weaker staining and vice-versa. Data are reported as means \pm SD for 1340 measurements. A, Quantitative comparison of neurofilament heavy (NF-H) subunit immunostaining. Cell bodies of ALS cases were significantly more stained than cell bodies of control cases ($P < 0.05$, Mann-Whitney test). B, Neurofilament medium (NF-M) subunit and C, neurofilament light (NF-L) subunit did not present a significant difference between groups.



(19,20). The immunoreaction for the NF-L subunit, as described in our results, was discrete in neuronal perikarya and mild to moderate in the processes. This last result agrees with data reported by others (12,15, 23,24), showing that this subunit is more central to the axis of the filament since it is involved in the arrangement of the core filament, and therefore is less exposed to the antibody.

The classical morphological features of ALS such as dramatic neuronal loss, inclusion bodies associated with intracytoplasmic organelle displacement, atrophic neurons, and extensive gliosis were all present in our cases (6).

The results obtained by immunohistochemistry for ALS cases showed accumulations of immunostaining for all tested antibodies in the perikarya of motor neurons of the ventral horn of the spinal cord. Accumulations of NF proteins, as observed in our cases, can result in abnormalities in the axonal cytoskeleton, leading to a gradual block of axonal transport (4). Various factors may lead to the formation of abnormal accumulations, including dysregulation of intermediate filament gene expression, NF mutations and post-translational modifica-

tions such as phosphorylation, glycosylation, nitration, and protein cross-linking (25). It is clear from this and previous studies (11,25) that the integrity of the NF network is undoubtedly essential to motor neuron survival and that this network becomes disrupted during motor neuron degeneration. Of particular relevance is the observation that NF inclusions are also found in cases of familial ALS caused by superoxide dismutase mutations, implying a toxic action of NFs in the disease (26).

Statistical analysis of our data confirmed a significant increase of immunoreaction for the antibody used for NF-H, while the increase in NF-M and NF-L was not statistically significant. Our observations indicate that, although all NF subunits seem to be involved in the disease, the NF-H subunit plays a major role in the pathogenesis of ALS. A possible explanation for the nonsignificant results for NF-M and NF-L is the fact that we used only 3 subjects. Thus, if more cases had been available the results for NF-M and NF-L might have been significant.

Large neurons, with their fast conducting, large caliber axons require a high content of NFs for structural support and integrity (27). Since NF-rich motor neurons are preferentially affected in human ALS, the quantity of NFs may be important in this selective neuronal vulnerability. Moreover, NF-H plays a major role in the maintenance of fiber caliber since its tail domain is a structural component of cross bridges and is involved in the formation of parallel bundles in NFs (18). In agreement with these observations, Kriz and collaborators (28) reported that transgenic mice expressing high levels of human NF-H proteins present NF inclusions in the perikarya resulting in atrophy of motor axons and altered axonal conductances.

There is growing evidence of a direct participation of NF in many neurological diseases. Hedreen and Koliatsos (29) described in the brains of patients with stroke and other focal lesions the presence of the

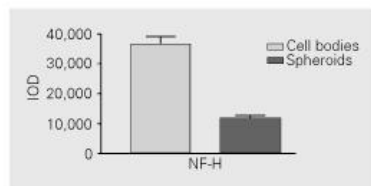


Figure 3. Quantitative analysis of neurofilament heavy (NF-H) subunit on axonal spheroids compared to immunostaining of this subunit in the cell bodies. The difference between the spheroids and cell bodies immunostaining was not significant (Mann-Whitney test) because in this case the comparison was done between amyotrophic lateral sclerosis (ALS) cases; therefore, the sample size was 3 for both groups. In the other comparisons, however, the sample size was the same for ALS cases (N = 3) but larger (N = 5) for control cases. IOD = integrated optical density.

phosphorylated form of NF-H in neuronal perikarya, where it is not normally observed. We have recently observed an increase of NF immunoreaction in degenerating axons of the rat optic nerve following removal of the eyes (30). The present study supports the view that NFs also play a possible role in the pathogenesis of ALS. Furthermore, we present quantitative evidence that the phosphorylated form of the NF-H subunit is the main protein involved in this disease. What is the possible explanation or cause of these observations? We believe that an abnormal phosphorylation of NF-H can induce a cytoskeletal disorder, leading to massive accumulations of hyperphosphorylated protein in the neuronal perikarya and proximal neurites as described by other investigators (31). The literature shows that many factors may account for the formation of NF aggregates in ALS. Recently, it was suggested that glutamate-mediated excitotoxicity, which is one of the factors associated with the pathogenesis of ALS, induces NF side-arm hyperphosphorylation in neurons, leading to an impairment of NF transport (32). Also, in approximately 1% of sporadic ALS cases there is a mutation in the KSP repeats of the carboxyl terminus of the NF-H gene corresponding to the phosphorylation sites (4). This mutation may also account for the formation of NF inclusions in ALS cases since it was not observed in over 300 normal individuals (4). Another possible cause of NF accumulation and subsequent neurodegeneration in ALS is a failure of the capacity of proteolytic degradation of the aggregates, via the ubiquitin-proteasome pathway, as already described in other neurological diseases (33,34).

Another interesting finding of the present

study was the presence of NF-H-positive spheroids in all ALS cases. Spheroids are considered to be a conspicuous and early finding in proximal axons of motor neurons in ALS (35). Although their significance in ALS has not been completely established, they have been described in conditions associated with impairment of axonal transport (36). Our quantitative results showed the presence of phosphorylated NF-H subunits in spheroids. It is possible that hyperphosphorylation increases disassembly of NF thus impairing their axonal transport, as suggested previously (37). A failure of proteolytic degradation might also be associated with accumulation of NF and other intermediate filaments, such as peripherin, in axonal spheroids (35). The presence of phosphorylated NF-H in both the neuronal perikarya and spheroids of ALS cases suggests a possible role of this subunit in the pathogenesis of ALS.

Despite all the evidence presented above, an unresolved question is whether the accumulating NFs are merely by-products of the pathogenic process or active participants in motor neuron dysfunction. However, our observations may contribute to the idea that the high NF content in motor neurons may account for the selective vulnerability of these neurons and that the heavy subunit may have a crucial role in the disease process.

Acknowledgments

We would like to thank Heliomar Pereira Marcos and Suely Menezes da Cunha for excellent technical assistance and Suelen Adriani Marques for helpful suggestions regarding the immunohistochemistry technique.

References

1. Julien JP (2001). Amyotrophic lateral sclerosis: unfolding the toxicity of the misfolded. *Cell*, 104: 581-591.
2. Rowland LP & Shneider NA (2001). Medical progress: amyotrophic lateral sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 344: 1688-1700.
3. Talbot K (2002). Motor neuron disease. *Postgraduate Medical Journal*, 78: 513-519.
4. Lee MK & Cleveland DW (1996). Neuronal intermediate filaments. *Annual Review of Neuroscience*, 19: 187-217.

5. Schmidt ML, Carden MJ, Lee VM-Y & Trojanowski JQ (1987). Phosphate dependent and independent neurofilament epitopes in the axonal swellings of patients with motor neuron disease and controls. *Laboratory Investigation*, 56: 282-294.
6. Louvel E, Hugon J & Doble A (1997). Therapeutic advances in amyotrophic lateral sclerosis. *Trends in Pharmacological Sciences*, 18: 196-202.
7. Hirano A (1996). Neuropathology of ALS: an overview. *Neurology*, 47 (Suppl 2): 63-66.
8. Bredesen DE, Pazos W, Goto JJ, Rabizadeh S, Roe JA, Gralla EB, Ellerby LM & Valentine JS (1996). Cell death mechanisms in ALS. *Neurology*, 47 (Suppl 2): 36-39.
9. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA & Sapp P (1993). Mutations in CuZn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362: 59-62.
10. Carpenter S (1969). Proximal axonal enlargement in motor neuron disease. *Neurology*, 18: 841-851.
11. Hoffman PN, Griffin JW & Price DL (1984). Control of axonal caliber by neurofilament transport. *Journal of Cell Biology*, 99: 705-714.
12. Hirokawa N, Glicksman MA & Willard MB (1984). Organization of mammalian neurofilament polypeptides within the neuronal cytoskeleton. *Journal of Cell Biology*, 66: 351-366.
13. Napolitano EW, Chin SSM, Colman DR & Liem RKH (1987). Complete amino acid sequence and *in vitro* expression of rat NF-M, the middle molecular weight neurofilament protein. *Journal of Neuroscience*, 7: 2590-2599.
14. Schlaepfer WW & Freeman LA (1978). Neurofilament proteins of rat peripheral nerve and spinal cord. *Journal of Cell Biology*, 78: 653-662.
15. Carden MJ, Schlaepfer WW & Lee VM-Y (1985). The structure, biochemical properties, and immunogenicity of neurofilament peripheral regions are determined by phosphorylation state. *Journal of Biological Chemistry*, 260: 9805-9814.
16. Julien JP & Mushynski WE (1982). Multiple phosphorylation sites in mammalian neurofilament polypeptides. *Journal of Biological Chemistry*, 257: 10467-10470.
17. Geisler N, Vandekerckhove J & Weber K (1987). Location and sequence characterization of the major phosphorylation sites of the high molecular mass neurofilament proteins M and H. *FEBS Letters*, 221: 403-407.
18. Chen J, Nakata T, Zhizeng Z & Hirokawa N (2000). The c-terminal tail domain of neurofilament protein-H (NF-H) forms the cross-bridges and regulates neurofilament bundle formation. *Journal of Cell Science*, 113: 3861-3869.
19. Betts C, Blackstock WP, Ward MA & Anderton BH (1997). Identification of phosphorylation sites on neurofilament proteins by nanoelectrospray mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 12922-12927.
20. Nixon RA, Paskevich PA, Sihag RK & Thayer CY (1994). Phosphorylation on carboxyl terminus domains of neurofilament proteins in retinal ganglion cell neurons *in vivo*: influences on regional neurofilament accumulation, interneurofilament spacing, and axonal caliber. *Journal of Cell Biology*, 126: 1031-1046.
21. Tsang YM, Chiong F, Kuznetsov D, Kasarskis E & Geula C (2000). Motor neurons are rich in non-phosphorylated neurofilaments: cross-species comparison and alterations in ALS. *Brain Research*, 861: 45-58.
22. Inoué S & Spring KR (1997). *Video Microscopy*, 2nd edn. Plenum Press, New York.
23. Fuchs E & Cleveland DW (1996). A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science*, 279: 514-519.
24. Geisler N & Weber K (1981). Self-assembly *in vitro* of the 68,000 molecular weight component of the mammalian neurofilament triplet proteins into intermediate-sized filaments. *Journal of Molecular Biology*, 151: 565-571.
25. Julien JP (1999). Neurofilament functions in health and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 9: 554-560.
26. Rouleau GA, Clarke AW, Rooke K, Pramatarova A, Krizus A, Suchowersky O, Julien JP & Figlewicz DA (1996). SOD1 mutation is associated with accumulations of neurofilaments in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 39: 128-131.
27. Xu Z, Marszalek JR, Lee MK, Wong PC, Folmer J, Crawford TO, Hsieh S-T, Griffin JW & Cleveland DW (1996). Subunit composition of neurofilaments specifies axonal diameter. *Journal of Cell Biology*, 133: 1061-1069.
28. Kriz J, Meier J, Julien JP & Padjen AL (2000). Altered ionic conductances in axons of transgenic mouse expressing the human neurofilament heavy gene: a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology*, 163: 414-421.
29. Hedreen JC & Koliatsos VE (1994). Phosphorylated neurofilaments in neuronal perikarya and dendrites in human brain following axonal damage. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 53: 663-671.
30. Marques SA, Taffarel M & Martinez AMB (2003). Participation of neurofilament proteins in axonal dark degeneration of rat's optic nerves. *Brain Research*, 969: 1-13.
31. Bajaj NPS, al-Sarraj ST, Leigh PN, Anderson V & Miller CCJ (1999). Cyclin dependent kinase-5 (CDK-5) phosphorylates neurofilament heavy (NF-H) chain to generate epitopes for antibodies that label neurofilament accumulations in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and is present in affected motor neurones in ALS. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 23: 833-850.
32. Ackerley S, Grierson AJ, Brownlee J, Thornhill P, Anderton BH, Leigh PN, Shaw CE & Miller C (2000). Glutamate slows axonal transport of neurofilaments in transfected neurons. *Journal of Cell Biology*, 150: 165-176.
33. Chung KKK, Dawson VL & Dawson TM (2001). The role of the ubiquitin-proteasomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *Trends in Neurosciences*, 24 (Suppl 11): 7-14.
34. Alves-Rodrigues A, Gregori L & Pereira MEF (1998). Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration. *Trends in Neurosciences*, 21: 516-520.
35. Migheli A, Pezzulo T, Attanasio A & Schiffer D (1993). Peripherin immunoreactive structures in amyotrophic lateral sclerosis. *Laboratory Investigation*, 68: 185-191.
36. Deslisle MB & Carpenter S (1984). Neurofibrillary axonal swellings and amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 63: 241-250.
37. Toyoshima I, Yamamoto A, Masamune O & Satake M (1989). Phosphorylation of neurofilament proteins and localization of axonal swellings in motor neuron disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 89: 269-277.

Expression of ubiquitin and proteasome in motoneurons and astrocytes of spinal cords from patients with amyotrophic lateral sclerosis

D.M.F. Mendonça^a, L. Chimelli^b, A.M.B. Martinez^{a,*}

^a Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Brig. Trompowsky, s/n, Bl. F, 21941-540 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^b Serviço de Anatomia Patológica, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Received 30 May 2006; accepted 1 June 2006

Abstract

Proteasome, ubiquitin, GFAP and neurofilament were evaluated in motoneurons and astrocytes of spinal cords of ALS and control cases. ALS neurons exhibited ubiquitin positive inclusions and areas of strong immunoreaction for proteasome. Areas of proteasome stain were observed close to neurofilament positive proximal process enlargement. The percentage of neurons strongly immunoreacted, for proteasome was higher in ALS cases than in controls. Many astrocytes were positive for ubiquitin and proteasome. These results suggest that the ubiquitin–proteasome pathway is involved in the ALS pathogenesis and agree with the view that ALS is a disorder of protein aggregation that affects neurons and nonneuronal cells.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Amyotrophic lateral sclerosis; Neurofilament; Ubiquitin; Proteasome; Immunohistochemistry

The main histopathological characteristic of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the loss of large motoneurons of the spinal cord, brain stem and motor cortex accompanied by extensive gliosis. A common hallmark of the disease is the presence of ubiquitin positive inclusion bodies in neurons [6,24]. Ubiquitin is a small protein that plays a role in the degradation of many cellular proteins. It is activated by E1-activating enzymes, transferred to ubiquitin by E2-conjugating enzyme and then joined to protein substrates by E3-ubiquitin ligases. Degradation is enhanced when more than one ubiquitin is attached to the target protein to form polyubiquitin chains. Ubiquitination of proteins indicates that they must be degraded by a multicomponent enzymatic complex, the proteasome [12,27].

Proteasomes are large multisubunit proteases that are found in intracellular space of eukaryotic cells. The 20S proteasome is the catalytic core of 26S proteasome and is composed of 28 subunits arranged in four heptameric stacked rings to form a cylindrical structure. The outer and inner rings are formed by α and β subunits (α 1–7, β 1–7, β 1–7 and α 1–7), respectively [9].

The 20S proteasome hydrolyses most peptide bonds present in a protein. The 19S particle is the regulatory moiety of the 26S proteasome and confers ubiquitin/ATP-dependency to proteolysis by 26S proteasome [10,11,27].

The ubiquitin–proteasome system seems to play a crucial role in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. The close relationship between neurodegeneration and the ubiquitin system has long been implicated through the consistent findings of ubiquitin-positive intraneuronal inclusions in various neuropathological diseases [14,18,19,25]. This finding suggests that these diseases are associated with a neuron inability to degrade protein aggregates. In general, ubiquitin and ubiquitinated substrates are rapidly degraded and therefore do not accumulate in healthy cells. Failure to eliminate the ubiquitin–protein aggregates might be the result of either a malfunction of the ubiquitin–proteasome system or a structural change of some proteins, rendering them inaccessible to proteolysis [1,8,13]. In a previous study we showed neurofilament accumulation in spinal cords motoneurons of ALS cases [15]. Cytoskeletal abnormalities, including neurofilament aggregation, are one of the many hypotheses proposed to explain the mechanism of motor neuron degeneration in ALS. Whether these protein aggregates are by themselves pathogenic or are a consequence of a failure in

* Corresponding author. Tel.: +55 21 25626431; fax: +55 21 25626483.
E-mail address: martinez@histo.ufrj.br (A.M.B. Martinez).

the molecular system of protein degradation is a question that remains unsolved in ALS and other neurodegenerative diseases.

Despite the fact that astrogliosis is considered a histopathological hallmark of ALS [3], the participation of astrocytes in the molecular mechanism of ALS and other neurodegenerative diseases is a new emerging concept that has been postulated in recent years. Therefore, nowadays ALS is not considered as one of motor neurons in isolation but the result of interactions between neurons and glial cells [16,20]. However, the majority of ALS studies are only concerned with the histopathological characteristics of motor neurons degeneration and death. Here, we have considered the participation of astrocytes as well as neurons in ALS and control cases.

In the present study, we performed a morphological immunohistochemical analysis to evaluate the presence of GFAP, neurofilament, ubiquitin and proteasome in motoneurons and astrocytes of spinal cord from control and ALS cases. Our results show accumulation of ubiquitin and proteasome in ALS neurons and astrocytes, sometimes close to proximal process enlargement with increased immunoreactivity for the neurofilament heavy subunit. These findings suggest a dysfunction of the ubiquitin–proteasome pathway associated with accumulation of proteins in neuronal processes enlargements.

Spinal cords were obtained at autopsy from three sporadic ALS patients and from five patients without neurological disease (controls). The control patients suffered from one of the following diseases: hypertensive cardiopathy ($N=1$), aortic aneurysm ($N=1$), acute myocardial infarction ($N=1$), and acute respiratory failure ($N=2$). The average post-mortem interval was 4 h both in ALS and control cases. The spinal cords were fixed in 10% formalin for about two weeks. ALS cases were from male patients with no family history of ALS, aged from 44 to 65 years. The survival period after diagnosis varied from 9 months to 1 year and 6 months.

Formalin-fixed, 5- μ m paraffin-embedded tissue sections from cervical, thoracic, lumbar and sacral levels were obtained and collected on gelatin-coated glass slides and stained with hematoxylin-eosin and luxol fast blue for morphological analysis, or immunostained with the antibodies against heavy neurofilament subunit (Sigma), free ubiquitin and polyubiquitin chains (Dako), proteasome $\alpha\beta$ subunits (Biomol) and GFAP (Novocastra). Sections were observed and photographed with a Zeiss Axioskop 2 plus Microscope.

The sections were treated with 3% peroxide hydrogen in order to block the endogenous peroxidase and then rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.3% Triton. After incubation for 1 h with 10% normal goat serum in PBS-0.3% Triton, the sections were microwave treated (1 min, twice) in order to expose hidden epitopes and then reacted with a primary antibody overnight at 4 °C. We used the following primary antibodies: anti-ubiquitin (1:200), anti-proteasome ($\alpha\beta$ subunits) (1:2000), anti-neurofilament (heavy subunit) (Clone NE-14 – 1:80) and anti-GFAP (1:100). Sections were then incubated with the corresponding secondary antibody for 2 h. After reaction with the avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain ABC Kit, Vector) reactivity was visualized using the following chromogens: DAB (anti-proteasome, anti-neurofilament), SG (anti-GFAP)

and AEC (anti-ubiquitin). Primary antibodies were omitted for negative controls. Hematoxylin was used for nuclear staining in some sections. Sections were dehydrated in a graded alcohol series, cleared in xylene and coverslipped under permount.

The number of neuron cell bodies exhibiting strong staining for proteasome $\alpha\beta$ in the anterior horns of control and ALS spinal cords was quantified. Two or three sections from cervical, thoracic and lumbar spinal cord levels were used from ALS and control cases. Statistical analysis was performed with the Prism software (GraphPad Inc.) using the two-way ANOVA test ($P<0.05$). It is important to emphasize that immunohistochemistry was performed at the same time for all sections used in the quantitative study.

ALS is nowadays considered a disorder of multiple etiologies; however, the factor that triggers the disease process is not known. In this report we give qualitative and quantitative data on the participation of ubiquitin and proteasome in the disease, and discuss the results in terms of abnormal protein aggregation in neurons. We also give evidence of astrocyte participation in the disease pathobiology.

In our morphological analysis we observed that control spinal cord sections displayed normal motoneurons and astrocytes, as shown in Fig. 1A. In ALS cases, neurons exhibited cytoplasmic inclusions corresponding to Bunina bodies (Fig. 1B), intracytoplasmic organelle displacement (Fig. 1B) and signs of astrogliosis characterized by enlargement of astrocytes cytoplasm and its processes (Fig. 1B).

It was possible to identify in ALS neurons the classic ubiquitin positive aggregates (skeins) (Fig. 1C), which are described as the major pathological feature of the disease [8]. Immunoreactivity for proteasome in control cases was weak and equally distributed throughout the neuronal perikarya (Fig. 1D). In ALS cases, the majority of the surviving neurons presented intense immunoreactivity for proteasome $\alpha\beta$. In some of them, areas of intense focal staining were observed, indicating an accumulation of the proteasome subunits (Fig. 1E). In a few cases we observed a neuron with a strong immunoreaction in areas adjacent to a swollen process suggestive of spheroid, which was not stained for proteasome (Fig. 1F), but was positive for the neurofilament heavy subunit (data not shown). Our quantitative analysis revealed that the proteasome expression was significantly increased in ALS spinal motoneurons when compared to control cases, at different spinal cord levels (Fig. 2).

Our results are different from the majority of previous reports stating that neurons of sporadic and familial ALS cases are not positive for proteasome 20S [25]. Interestingly, only one report described positive inclusions for proteasome 19S and not for proteasome 20S, in a sporadic ALS case [21]. However, these authors observed these positive inclusions only in the pyramidal neurons of the hippocampus and not in the spinal cord motoneurons. Another important difference between our reports is that our antibody recognizes α and β subunits of the 20S catalytic core, while their antibodies recognize the 19S particle and the α subunit of the 20S proteasome. Ubiquitinated proteins are degraded by the 26S proteasome through the coordinated work of the 19S regulatory moiety that contains ATPases and other enzymes, and the 20S subunit which contains the pro-

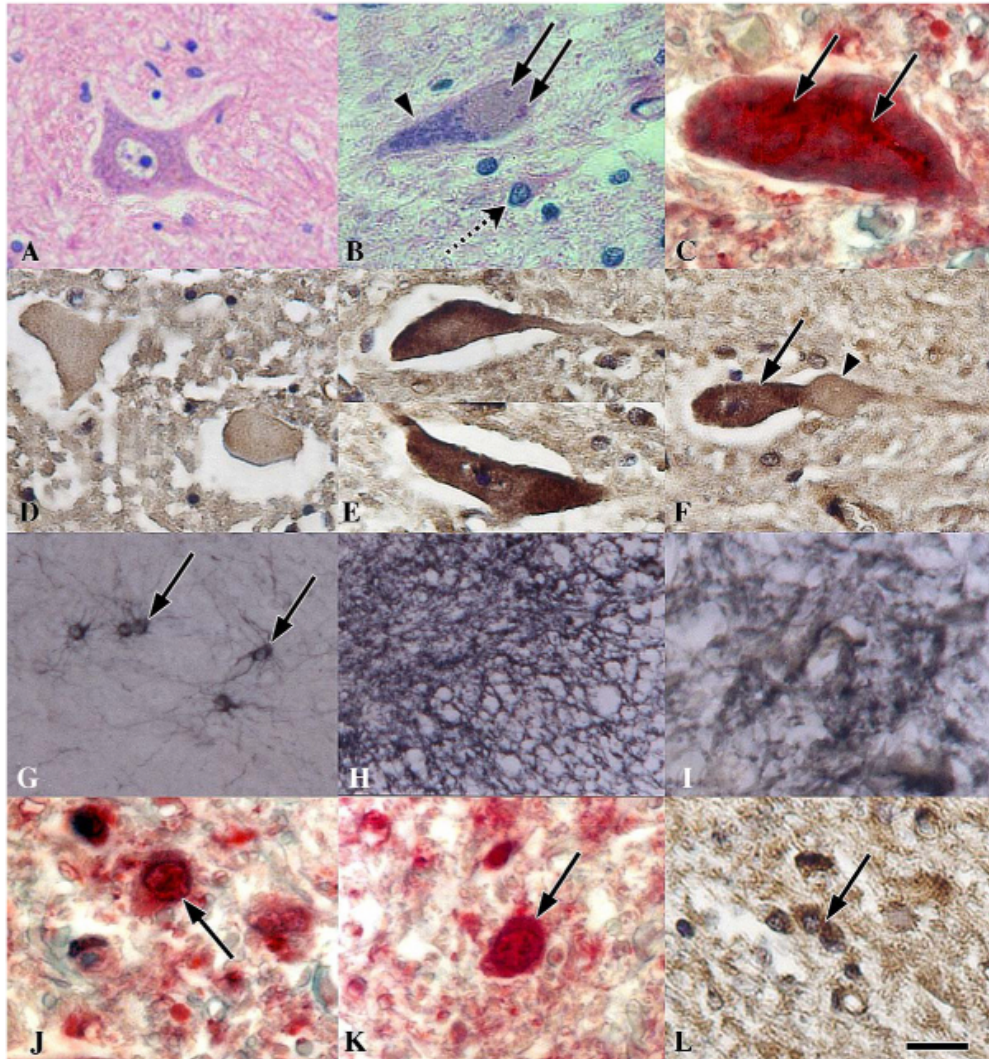


Fig. 1. (A) Normal motoneurons and astrocytes in spinal cord sections of a control case. (B) Bunina inclusion bodies (full arrows), intracytoplasmic organelle displacement (arrowhead) and enlargement of astrocytes cytoplasm and processes (arrow) in ALS case. (C) Ubiquitin positive inclusion bodies (arrows) in neurons of an ALS case. (D) Light immunoreactivity for proteasome in neurons of a control case. (E, F) Intense focal staining of proteasome in perikarya (E) and areas adjacent (arrows) to a process enlargement – arrowhead) in neurons of ALS cases. (G) Immunoreactivity for GFAP in control case (arrows). (H, I) Immunoreactivity for GFAP in ALS cases. (J, K) Immunoreactivity for ubiquitin in astrocytes of ALS case (arrows). (L) Immunoreactivity for proteasome in astrocytes of an ALS case (arrow). Scale bar: (A, B, D, E, F, I, J, K) 23 μm , (G, H, L) 47 μm and (C) 57 μm .

teolytic active sites. Therefore, it is possible to suggest that any dysfunction in one or another subunit would impair the proteasome activities. One of the functions of ubiquitin–proteasome system is the removal of misfolded or damaged proteins [9]. Abnormal proteins aggregations could generate an increase in the levels of proteolysis in intracellular compartments, which could recruit cytosolic pools of ubiquitin and proteasome. This fact explains the increase of immunoreactivity for ubiquitin and proteasome in some regions of the neurons cell bodies and processes, as we have observed. Besides, aggregation of proteins such as ubiquitin, neurofilament, tau and β -amyloid [7,17,26]

is a common hallmark of the disease. The accumulation of proteins could make them inaccessible to degradation by the ubiquitin–proteasome pathway. This impairment could happen as a consequence of oxidative alterations of the aggregated proteins due to ROS generation. Another possible mechanism is that this enzymatic complex could not function appropriately and therefore would not be able to degrade these proteins and they would accumulate in healthy neurons.

In our sections, immunohistochemistry for GFAP revealed positively stained astrocytes in control cases (Fig. 1G). These cells were sometimes observed around morphologically normal

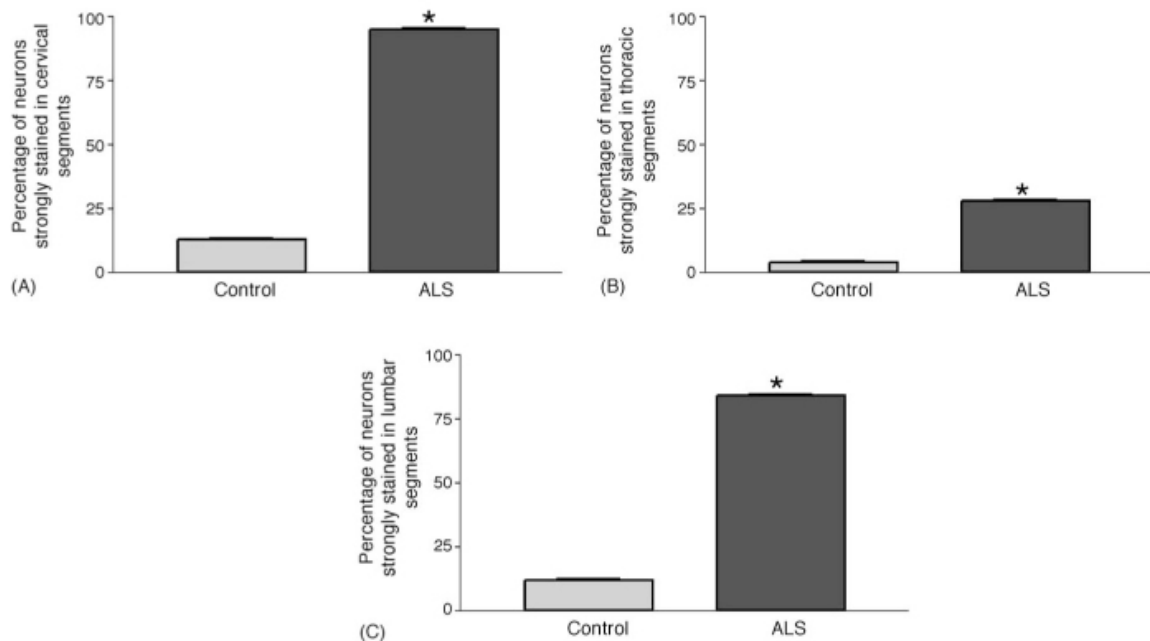


Fig. 2. Percentage of neurons intensely stained for proteasome in cervical (A), thoracic (B) and lumbar (C) spinal cord levels from ALS and control cases. The difference between the percentages of neurons intensely stained for proteasome was significant between control and ALS cases in all spinal cord levels ($P < 0.05$).

motoneurons. In ALS cases however, these cells were more intensely labeled for GFAP and their processes extended for longer areas forming a complex network (Fig. 1H and I). We also observed, in all ALS cases, astrocytes with intense immunoreactivity for ubiquitin. The protein was often observed in the nuclei and in the cytoplasm of astrocytes (Fig. 1J and K). Moreover, in ALS cases, some astrocytes also exhibited strong proteasome immunoreaction throughout the anterior horn of the spinal cord (Fig. 1L). Interestingly, materials obtained from control cases were not positive for either antibody suggesting that astrocytes are involved in the pathogenesis of ALS.

Extensive astrogliosis is considered a common hallmark of ALS and other neurodegenerative disorders [13]. In recent years there has been increasing interest in the idea that astrocytes are primarily involved in the pathogenesis of ALS and other neurodegenerative diseases [16,20]. These cells have a strong interaction with neurons and are important for the maintenance of the neuronal microenvironment. Several studies have provided clues to the participation of astrocytes in the pathogenesis of ALS [2,4,16,20]. A possible mechanism that may contribute to the disease is excitotoxicity promoted by elevated levels of glutamate neurotransmitter which activates reactive oxygen species (ROS) in motoneurons. Extracellular levels of glutamate are regulated by transporters, mainly those present in the membrane of astrocytes [2]. It seems that increased ROS production induces dysfunction of these transporters in the membrane of astrocytes which in turn will also cause an increase in glutamate, a toxic molecule to motoneurons. This dysfunction could be involved in several abnormalities of astrocytes including malfunction of ubiquitin–proteasome system.

Our results suggest that the ubiquitin–proteasome system is involved in the pathogenesis of ALS, since we report here a strong expression of these proteins in the spinal cord of ALS cases. This increased stain could represent dysfunction of this pathway in neurons and in astrocytes of ALS cases. Thus, the ubiquitin–proteasome pathway can be directly or indirectly involved in the pathogenesis of the disease and its dysfunction can alter the metabolism of neurons leading them to degeneration. It can also alter the metabolism of astrocytes, which can in turn affect neurons. In fact, we know that these cells play an important role in the maintenance of the neuronal microenvironment. Our results are in accordance with the recent view that ALS, similar to other neurodegenerative diseases, is a disorder of protein aggregation that affects neurons [22,23] and nonneuronal cells, such as astrocytes [5] and microglia [23]. In this context malfunction of the ubiquitin–proteasome pathway would be explained since we know that this system is primarily involved in the degradation of oxidized and damaged proteins.

Acknowledgments

We would like to thank Mr. Heliomar Pereira Marcos and Mrs. Suely Menezes da Cunha for excellent technical assistance.

References

- [1] A. Alves-Rodrigues, L. Gregori, M.E.F. Pereira, Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration, *Trends Neurosci.* 21 (1998) 516–520.

- [2] C.M. Anderson, R.A. Swanson, Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions, *Glia* 32 (2000) 1–14.
- [3] L.H. Barbeito, M. Pehar, P. Cassina, M.R. Vargas, H. Peluffo, L. Vieira, A.G. Estevez, J.S. Beckman, A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis, *Brain Res. Rev.* 47 (2004) 263–274.
- [4] E.E. Benarroch, Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system, *Mayo Clin. Proc.* 80 (2005) 1238–1326.
- [5] L.I. Bruijn, M.W. Becher, M.K. Lee, K.L. Anderson, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, S.S. Sisodia, J.D. Rothstein, D.R. Borchelt, D.L. Price, D.W. Cleveland, ALS-Linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions, *Neuron* 18 (1997) 327–338.
- [6] L.I. Bruijn, T.M. Miller, D.W. Cleveland, Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS, *Annu. Rev. Neurosci.* 27 (2004) 723–749.
- [7] N.Y. Calingasan, J. Chen, M. Kiaei, M.F. Beal, β -amyloid 42 accumulation in the lumbar spinal cord motor neurons of amyotrophic lateral patients, *Neurobiol. Dis.* 19 (2005) 340–347.
- [8] K.K.K. Chung, V.L. Dawson, T.M. Dawson, The role of the ubiquitin-proteasomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders, *Trends Neurosci.* 24 (2001) 7–14.
- [9] Q. Ding, J.N. Keller, Proteasomes and proteasome inhibition in the central nervous system, *Free Radic. Biol. Med.* 31 (2001) 574–584.
- [10] S. Elsasser, D. Finley, Delivery of ubiquitinated substrates to protein-unfolding machines, *Nat. Cell Biol.* 7 (2005) 742–749.
- [11] M.H. Glickman, D. Raveh, Proteasome plasticity, *FEBS Lett.* 13 (2005) 3214–3223.
- [12] Y.A. Lam, C.M. Pickart, A. Alban, M. Landon, C. Jamieson, R. Ramage, R.J. Mayer, R. Layfield, Inhibition of ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease, *PNAS* 97 (2000) 9902–9906.
- [13] R. Layfield, A. Alban, R.J. Mayer, J. Lowe, The ubiquitin protein catabolic disorders, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 27 (2001) 171–179.
- [14] K. Mather, F.Z. Watts, M. Carroll, P. Whitehead, M. Swash, N. Cairn, J. Burke, Antibody to an abnormal protein in amyotrophic lateral sclerosis identifies Lewy body-like inclusions in ALS and Lewy bodies in Parkinson's disease, *Neurosci. Lett.* 160 (1993) 13–16.
- [15] D.M.F. Mendonça, L. Chimelli, A.M.B. Martinez, Quantitative evidence for neurofilament heavy subunit aggregation in motor neurons of spinal cords of patients with amyotrophic lateral sclerosis, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38 (2005) 925–933.
- [16] S.D. Rao, J.H.W. Weiss, Excitotoxic and oxidative cross-talk between motor neurons and glia in ALS pathogenesis, *Trends Neurosci.* 27 (2004) 17–23.
- [17] S. Sasaki, M. Iwata, Immunoreactivity of β -amyloid precursor protein in amyotrophic lateral sclerosis, *Acta Neuropathol.* 97 (1999) 463–468.
- [18] D. Schiffer, A. Attanasio, A. Chio, A. Migheli, T. Pezzulo, Ubiquitinated dystrophic neurites suggest corticospinal derangement in patients with amyotrophic lateral sclerosis, *Neurosci. Lett.* 180 (1994) 21–24.
- [19] D. Schiffer, L. Autilio-Gambetti, A. Chio, P. Gambetti, M.T. Giordana, F. Gullotta, A. Migheli, M.C. Vigliani, Ubiquitin in motor neuron disease: study at the light and electron microscope, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 50 (1991) 463–473.
- [20] G. Seifert, K. Schilling, C. Steinhäuser, Astrocytes dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective, *Nat. Rev.* 7 (2006) 194–206.
- [21] D. Seilhean, J. Takahashi, K.H. El Hachimi, H. Fujigasaka, A.S. Lebre, V. Biancalana, A. Durr, F. Salachas, J. Hogenhuis, J.J. Hauw, V. Meininger, A. Brice, C. Duyckaerts, Amyotrophic lateral sclerosis with neuronal intranuclear protein inclusions, *Acta Neuropathol.* 108 (2004) 81–87.
- [22] M.J. Strong, Amyotrophic lateral sclerosis, *Expert Opin. Investig. Drugs* 13 (2004) 1593–1614.
- [23] M.J. Strong, S. Kesavapany, H.C. Pant, The pathobiology of amyotrophic lateral sclerosis: a proteinopathy? *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64 (2005) 1–16.
- [24] M.E. Van Welsem, J.A. Hogenhuis, V. Meininger, W.P. Metsaars, J.J. Hauw, D. Seilhean, The relationship between Bunina bodies, skein-like inclusions and neuronal loss in amyotrophic lateral sclerosis, *Acta Neuropathol.* 103 (2002) 583–589.
- [25] M. Watanabe, M. Dykes-Hoberg, V.C. Culotta, D.L. Price, P.C. Wong, J.D. Rothstein, Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues, *Neurobiol. Dis.* 8 (2001) 933–941.
- [26] W. Yang, M.M. Sopper, C. Leystra-Lantz, M. Strong, Microtubule-associated tau protein positive neuronal and glial inclusions in ALS, *Neurology* 61 (2003) 1766–1773.
- [27] P. Zwickl, W. Baumeister, The proteasome-ubiquitin protein degradation pathway, *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 268 (2002) 212.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)