

# Tratamento da amiotrofia espinal infantil

Umbertina Conti Reed

Departamento de Neurologia

Disciplina de Neurologia Infantil

FMUSP

# Amiotrofia espinal infantil (AEI)

- Herança AR (supõe-se herança ligada ao X em alguns casos)
- Grande heterogeneidade clínica/genética → quadro motor puro ou associação com:
  - déficits sensitivos
  - hipoplasia cerebelar
  - surdez
  - cardiopatia congênita
  - artrogripose
  - fraturas ósseas ao nascimento
- AEI clássica devida a mutações no gene SMN em 5q12.2-q13.3
- AEI com comprometimento diafragmático (SMARD) devida a mutações no gene IGHMBP2) em 11q13

# Amiotrofia espinal infantil: SMARD

## Amiotrofia espinal infantil com comprometimento diafragmático ou disfunção respiratória tipo 1 (SMARD1)

- Gene da imunoglobulina micro-ligante (binding) proteína 2 (IGHMBP2): 11q13
- Retardo do crescimento intra-uterino, choro fraco, deformidades de pés
- Manifesta-se entre um e seis meses de idade
- Paralisia diafragmática e fraqueza muscular progressiva de **predomínio distal**
- Alterações de **sensibilidade e disfunção autonômica** podem ocorrer
- Diagnóstico deve ser lembrado em pacientes gravemente comprometidos:
  - na ausência de mutações em 5q
  - em casos de morte súbita de RN na família
- Análise das mutações é possível mas não há diagnóstico pré-natal disponível

# AEI: locus 5q12.2-q13.3

## Gene *survival motor neuron* (SMN)

- Degeneração dos motoneurônios espinais e dos núcleos de alguns nervos cranianos
- Incidência: ~ 1: 10000
- Frequência de portadores: 1: 50
- Herança autossômica recessiva: diferentes tipos de mutações na cópia telomérica do gene *survival motor neuron* (SMN1) em 5q12.2- q13.3
- Diagnóstico molecular possível e acessível, inclusive pré-natal em amostra de vilosidade coriônica:
  - detecção da mutação em SMN1
  - análise de ligação - marcadores microsatélites da região 5q13

# Amiotrofia espinal infantil (5q11- q13)

## Mecanismo molecular

- **Gene SMN:**
  - cópia telomérica: gene SMN1
  - cópia centromérica: gene SMN2, que pode faltar em 5 a 10% da população normal porém está sempre presente nos pacientes com AEI
- A maior parte da proteína SMN completa vem do gene SMN1 porque durante a transcrição do gene SMN2 o exon 7 é freqüentemente excluído, o que codifica uma proteína normal, porém truncada e rapidamente degradável
- O gene SMN2 possui diversas cópias e no indivíduo afetado o número de cópias determina os diferentes fenótipos
  - uma ou duas cópias: AEI tipo I (até 20% de proteína SMN)
  - três cópias: forma intermediária
  - três a quatro cópias: AEI tipo III
  - cinco cópias: parentes portadores (60% de proteína SMN)

# Amiotrofia espinal infantil (5q11- q13)

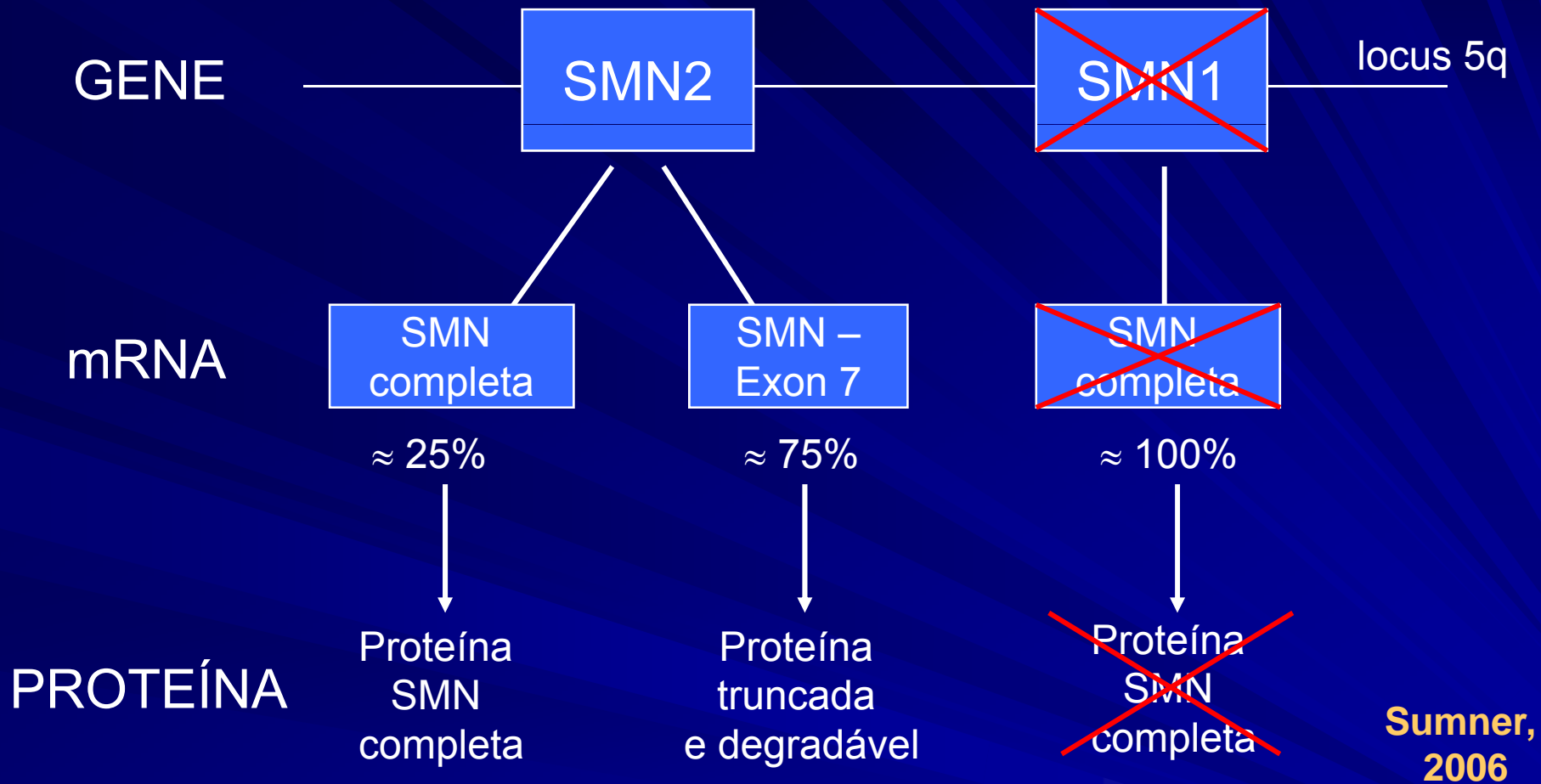
## Mecanismo molecular

Estes autores descrevem um método para avaliar o número de cópias em 48 horas

- [Huang CH](#), [Chang YY](#), [Chen CH](#), [Kuo YS](#), [Hwu WL](#), [Gerdes T](#), [Ko TM](#). Copy number analysis of survival motor neuron genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Genet Med* 2007; 9: 241-8.

Outro trabalho que descreve a metodologia para dosagem de cópias:

- [Gómez-Curet I](#), [Robinson KG](#), [Funanage VL](#), [Crawford TO](#), [Scavina M](#), [Wang W](#). Robust quantification of the SMN gene copy number by real-time TaqMan PCR. *Neurogenetics*. 2007



### Mecanismo molecular da AEI:

- a mutação em homozigose em SMN1 resulta na falta da proteína completa e, embora seja retida pelo menos uma cópia do gene SMN2, portanto, uma parte da proteína truncada e pouquíssima da completa, estas não são suficientes para manter a função do motoneurônio

# Amiotrofia espinal infantil

## Proteína SMN

- Complexo macromolecular: proteína SMN e pelo menos outras 7 proteínas, as *geminas*
- Estas são expressas em todas as células, no citoplasma e no núcleo, onde chamam-se *gemas*
- O complexo SMN é regulado pelas geminas 2 e 6, sendo essencial na formação e agrupamento de várias pequenas proteínas ribonucléicas do núcleo celular (*snRNP*) que regulam o metabolismo do RNA (Feng et al, 2004, 2005)

# Amiotrofia espinal infantil

## Proteína SMN

- O agrupamento das snRNP regula diferentes aspectos do metabolismo do RNA:
  - “*splicing*” pré-RNA
  - transcrição do RNA
- O déficit da proteína SMN decorrente da mutação em SMN1 altera o agrupamento das snRNP, porém não se sabe o mecanismo pelo qual esta alteração causa a degeneração seletiva do motoneurônio (Feng et al, 2005)
- Recentemente, foi descrita uma nova ação da proteína SMN, diretamente nos axônios dos motoneurônios, que é independente da biossíntese das snRNP (Carrel, 2006)

Aumentar o nível da proteína SMN

**Ativar SMN2:**

- inibidores HDAC
- hidroxí-uréias
- quinazolonas

**Inclusão exon 7:**

- aclarubicina
- oligonucleotídeos sintéticos

**Estabilizar proteína SMN:**

- indoprofeno
- aminoglicosídeos
- inibição proteosoma

Mutação em SMN1 & retenção de SMN2 em N de cópias variável

Diminuição do mRNA da proteína SMN completa

Deficiência da proteína SMN

Defeito biogênese de snRNP

Defeito no transporte axonal de mRNA

Perda neuronal

Manifestações clínicas

**Terapia gênica:**

- substituição de SMN1

**Exercício**

**OPÇÕES DE TRATAMENTO**

**Neuroproteção:**

- riluzole
- fatores neurotróficos

**Substituição celular:**

- células-tronco embrionárias

Sumner CJ. Therapeutics development for spinal muscular atrophy. NeuroRX; 3: 235-45, 2006

# Amiotrofia espinal infantil

## Tratamento

### Opções de tratamento:

1. Aumentar o nível da proteína SMN
  - 1a. ativar o gene SMN2
  - 1b. evitar a exclusão do exon 7 no gene SMN2
  - 1c. estabilizar a proteína SMN
2. Estratégias de neuroproteção anti-apoptose
3. Terapia gênica para introduzir SMN1
4. Uso de células-tronco embrionárias para substituir motoneurônios ou células musculares

# Amiotrofia espinal infantil

Tratamento: **aumentar o nível da proteína SMN**

1a. Ativar o gene SMN2 - inibidores das histona-deacetilases (HDAC):

- a modulação da expressão gênica do SMN2 se dá através de acetilação e deacetilação de histonas no promotor SMN2
  - a acetilação através de histonas-acetilases **aumenta** a disponibilidade de DNA no processo de transcrição, portanto aumenta a expressão gênica
- o oposto acontece quando atuam as HDAC, portanto, **drogas que inibem as HDAC** podem favorecer a acetilação aumentando a expressão gênica
  - ***fenilbutirato de sódio, valproato de sódio (VPA)***

# Amiotrofia espinal infantil

## Tratamento: fenilbutirato

- Mercuri et al. Pilot trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord.* 2004; 14: 130-5.
  - 500 mg/kg/dia em 5 doses por via oral, alternando 7 dias de tratamento e 7 sem, mostrou melhora da habilidade funcional com 3 e 9 semanas de tratamento
- Brahe et al. Phenylbutyrate increases SMN gene expression in spinal muscular atrophy patients. *Eur J Hum Genet.* 2005; 13: 256-9.
  - 4-fenilbutirato de sódio aumenta a expressão do gene SMN *in vitro* e nos leucócitos de pacientes que receberam o sal por via oral
- Mercuri et al. Randomized, double blind, placebo controlled trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy. *Neurology* 2007; 68: 51-5.
  - 107 pacientes de 2 a 14 anos de idade (10 diferentes centros)
  - droga ou o placebo por 13 semanas
  - sem melhora de força, habilidade ou função pulmonar em relação ao grupo controle

# Amiotrofia espinal infantil

## Tratamento: ácido valpróico

- Brichta et al. Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. Hum Mol Genet. 2003; 12: 2481-9.
  - em cultura de fibroblastos de pacientes com AEI, o VPA em dose terapêutica aumenta o nível da proteína SMN2 de 2 a 4 vezes
- Sumner et al, 2003: resultados semelhantes
- Hahnen et al, 2006: demonstram o aumento do nível da proteína SMN2 no tecido cerebral de ratos e de humanos em cultura tratada com VPA, bem como em motoneurônios embrionários em ratos
- Tsai et al, 2006: demonstram a nítida melhora motora de ratos tratados com VPA

# Amiotrofia espinal infantil

## Tratamento: ácido valpróico

- O VPA, composto inibidor das HDAC, favorece a transcrição do gene SMN2 e, possivelmente, aumenta não apenas a quantidade, como também a estabilidade da proteína SMN
- Portanto, o VPA força o gene SMN2 a produzir grande número de transcritos completos
- E o que ocorre *in vivo*?

# Amiotrofia espinal infantil

## Tratamento: ácido valpróico

Brichta et al, 2006:

- Em 7 entre 10 pais de pacientes com AEI, o tratamento com VPA aumentou em até 13 X o nível da proteína SMN completa no sangue e, curiosamente, de apenas 3,4 X o nível do mRNA completo correspondente
- Em 20 pacientes com AEI, o tratamento com VPA:
  - aumentou em até 1,9 X o nível do mRNA completo do gene SMN2 em 7 pacientes
  - o nível permaneceu inalterado ou diminuiu em 13 pacientes
- Portanto, a resposta ao VPA é variável
- Resta saber se o aumento da expressão da proteína SMN no sangue corresponde ao mesmo aumento no motoneurônio e se acompanha de melhora da força muscular

Há poucos estudos concluídos: em 7 adultos com AEP-III, o VPA mostrou eficácia comprovada após 8 meses de tratamento (Weihl et al, 2006)

# Amiotrofia espinal infantil

## Tratamento: ácido valpróico

- Suplementação obrigatória com:
  - L-carnitina: 2 a 4 g/ dia
  - Vitamina B1: 200 a 400 mg/dia
  - Vitamina B2: 100 a 200 mg/dia
  - Vitamina C: 500 mg/dia
  - Vitamina E: 400 UI
  - Vitamina K?
  
- Possível disfunção mitocondrial

# Amiotrofia espinal infantil

## Tratamento

- Novos compostos inibidores das HDAC estão em estudo
- Poderiam ativar outros genes, por exemplo genes anti-apoptose, assim agindo como neuroprotetores, além de como mediadores do aumento do nível da proteína SMN2?

### Compostos promissores em estudo:

- quinazolina, indol
- SAHA (ácido subero-ilanilide hidroxâmico) **in vivo**: anticancerígeno em investigação, VO, excelente tolerabilidade, cruza a barreira hemato-encefálica e atinge concentrações que aumentam os níveis SMN (Hahnen et al, 2006)
- benzamida M344 **in vitro**: em cultura de fibroblastos de pacientes demonstrou o maior efeito já observado, atingindo todas as gemas de todos os núcleos; toxicidade somente em altas doses (Riessland et al, 2006)
- tricostatina A **em animais**: quando administrada precocemente, melhora o fenótipo (Avila et al, 2007).

# Amiotrofia espinal infantil

Tratamento: **aumentar o nível da proteína SMN**

1b. Evitar a exclusão do exon 7 no gene SMN2 - estratégias em desenvolvimento que já funcionam *in vitro*:

- aumentar a produção de Htra2- $\beta$ 1, proteína normalmente presente no organismo, que se liga diretamente a seqüências específicas de DNA em regiões que aumentam o “*splicing*”, assim funcionando como um fator corretor do “*splicing*” e **facilitando a inclusão do exon 7**
- produzir oligonucleotídeos sintéticos que se ligam ao transcrito do SMN2, **promovendo inclusão do exon 7 durante o “*splicing*”** (às vezes mimetizando proteínas naturais corretivas do “*splicing*”). Como levá-los aos motoneurônios?
  - aclarubicina: agente QT já testado, porém tóxico

# Amiotrofia espinal infantil

Tratamento: **aumentar o nível da proteína SMN**

## 1c. Estabilizar a proteína SMN2

- **aumentar sua tradução**
  - indoprofeno: aumenta a eficiência da tradução dos transcritos SMN2-derivados
  - aminoglicosídeos: alteram a tradução permitindo a leitura a partir de “*stop-codons*” e produzindo proteína levemente alongada, que é mais estável
  - ambos têm baixa penetração no SNC
- **inibir sua degradação:**
  - inibir o sistema ubiquitina-proteasoma, que degrada a proteína SMN

# Amiotrofia espinal infantil

## Tratamento

- Wolstencroft et al. A non-sequence-specific requirement for SMN protein activity: the role of aminoglycosides in inducing elevated SMN protein levels. Hum Mol Genet. 2005; 14: 1199-210.
  - Tratamento de cultura de fibroblastos de pacientes com **tobramicina e amicacina** resulta em aumento do número de gemas com a proteína SMN

# Tratamento da AEI

## 2. Identificar compostos neuroprotetores

A partir de células-tronco embrionárias diferenciadas em motoneurônios, há estudos tentando obter modelos de motoneurônios afetados *in vitro*

- Riluzole: já utilizado em experimentos animais, em pacientes com ELA, e em ensaios clínicos em pacientes com AEI
- Cardiotrofina1: fator neurotrófico administrado em experimentos animais através de vetor adenoviral
- Gabapentina: ~~já estudada em dois ensaios clínicos e considerada ineficaz~~

# Amiotrofia espinal infantil

## Tratamento

### 4. Terapia gênica:

- alguns resultados promissores em experimentos animais
- dificuldades técnicas para atingir o tecido-alvo, inserir o gene terapêutico no DNA hospedeiro, etc...

### 5. Células-tronco embrionárias que se diferenciam em motoneurônios:

- experimentos animais: células transplantadas em medula espinal sobrevivem e há crescimento de axônios nas raízes ventrais (Lee et al, 2007)

# Amiotrofia espinal infantil

## Tratamento

- O exercício poderia ativar genes que promovem a inclusão do exon 7 nos transcritos derivados de SMN2?
- Otimizar os protocolos clínicos ( ~ 25 em andamento, com ou sem dosagem de proteína):
  - selecionar grupos homogêneos de pacientes, ou seja, formar subgrupos de acordo com a gravidade dentro da AEI II e III
  - uniformizar os métodos de avaliação dos resultados do tratamento: medidas da função motora e respiratória, bem como da qualidade de vida

# Amiotrofia espinal infantil

## Tratamento

### Procura de marcadores para avaliar a eficácia do tratamento:

- viabilizar tecnologias que simplifiquem a medida do mRNA e a dosagem da proteína SMN no sangue periférico
  - [Simard et al.](#) Preclinical validation of a multiplex real-time assay to quantify SMNmRNA in patients with SMA. Neurology 2007;68:451-6.
    - metodologia para mRNA o qual permanece estável por três anos
  - [Vezain et al.](#) A sensitive assay for measuring SMN mRNA levels in peripheral blood and in muscle samples of patients affected with spinal muscular atrophy. Eur J Hum Genet, 2007.
- esclarecer até qual fase evolutiva o tratamento pode melhorar o prognóstico: o papel da proteína SMN no desenvolvimento do motoneurônio indica que o tratamento deveria ser instituído muito precocemente

# Amiotrofia espinal infantil

## Tratamento

### Uso de beta2-agonista: albuterol (salbutamol)

- Efeito anabolizante: induz hipertrofia e previne atrofia muscular após danos mecânicos ou bioquímicos à fibra?
- Já utilizada em pacientes com AEI (Kinali et al, 2002)
- Já utilizada em distrofias musculares e miopatias congênitas (VO, 2 mg 4 X / dia)
- Resulta em aumento da força muscular, da função motora e da massa muscular
- Continua em estudo em centros italianos com bons resultados preliminares