

Genes de sobrevivência do neurônio motor e a atrofia muscular espinhal 5q



Júlia Oliveira Costa¹, Caroline Christine Pincela da Costa²,
Nayane Soares de Lima³

¹ Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO

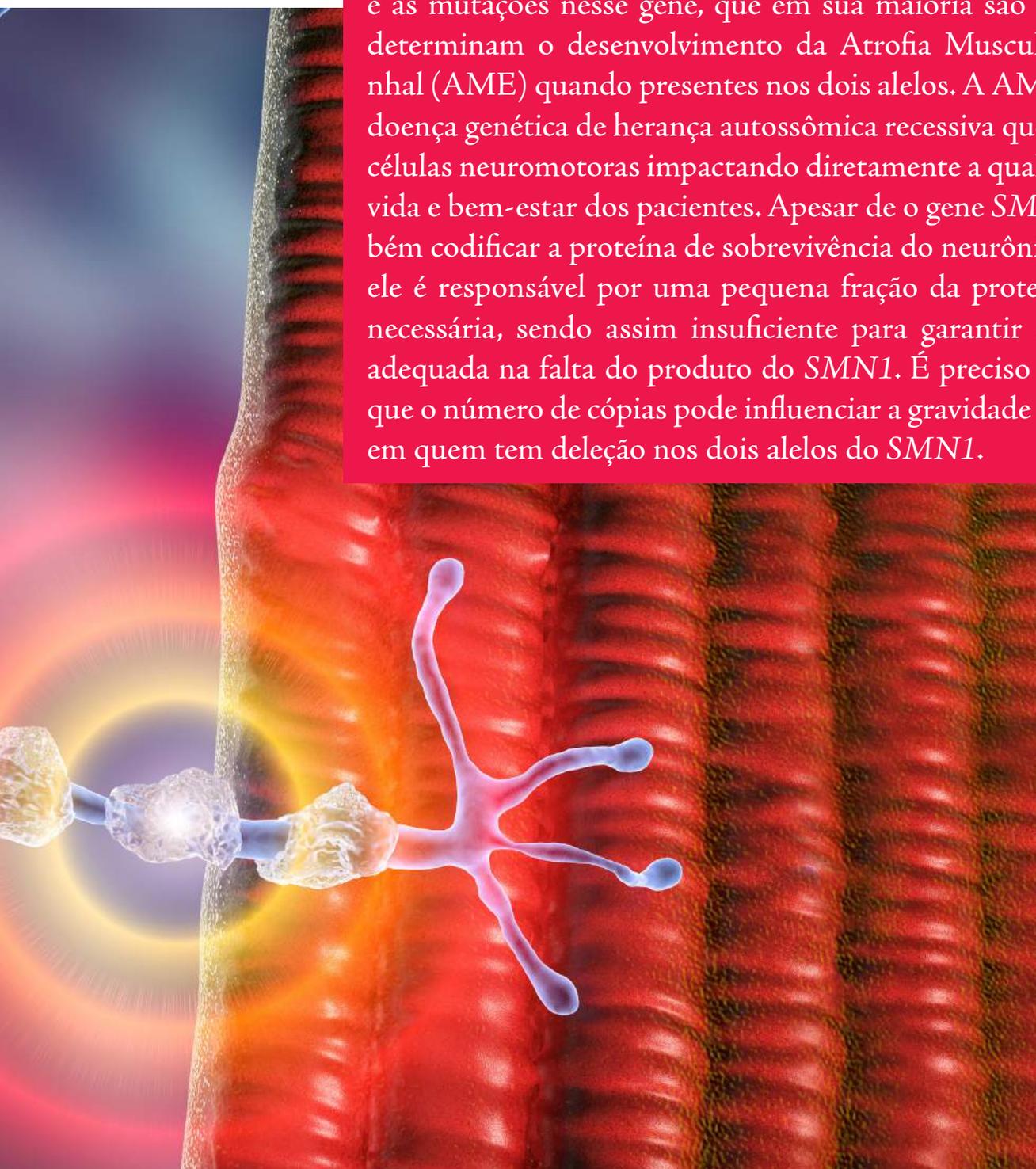
² Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO

³ Programa de Pós-Graduação em Assistência e Avaliação em Saúde, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO

Autor para correspondência – juliaoliveira@discente.ufg.br

Palavras-chave: doenças neuromusculares, mutações genéticas, neurônio motor, proteína SMN, AME, *splicing* alternativo

Os genes *SMN1* e *SMN2* são responsáveis por produzir uma proteína importante para a manutenção de neurônios motores, chamada de proteína de sobrevivência do neurônio motor. A maior parte da proteína produzida é codificada pelo *SMN1* e as mutações nesse gene, que em sua maioria são deleções, determinam o desenvolvimento da Atrofia Muscular Espinhal (AME) quando presentes nos dois alelos. A AME é uma doença genética de herança autossômica recessiva que afeta as células neuromotoras impactando diretamente a qualidade de vida e bem-estar dos pacientes. Apesar de o gene *SMN2* também codificar a proteína de sobrevivência do neurônio motor, ele é responsável por uma pequena fração da proteína total necessária, sendo assim insuficiente para garantir a função adequada na falta do produto do *SMN1*. É preciso observar que o número de cópias pode influenciar a gravidade da AME em quem tem deleção nos dois alelos do *SMN1*.



Genes *SMN1* e *SMN2* e o funcionamento de suas proteínas

Telômeros - São estruturas localizadas nas extremidades dos cromossomos constituídas por DNA com sequências nucleotídicas repetitivas associadas a proteínas características. Sua função é dar estabilidade às extremidades dos cromossomos.

Centrômeros - São estruturas presentes nos cromossomos, também conhecidos por constrição primária. São constituídos por DNA repetitivo centromérico e proteínas características e seu funcionamento, durante o processo de divisão celular, une os filamentos cromossômicos às fibras do fuso, facilitando esse processo.

Splicing - Retirada das regiões intrônicas de um pré-mRNA seguida da reunião das regiões restantes, originando um RNAm maduro que passa a conter somente éxons.

Isoformas proteicas - Formas distintas de uma mesma proteína que resultam da tradução dos RNAm distintos obtidos a partir do *splicing* alternativo de um mesmo RNA precursor.

O genoma humano possui dois genes *SMN*, localizados no mesmo cromossomo: o *SMN1*, que é descrito como uma cópia telomérica, pois é mais próxima desta região cromossômica, em direção aos **telômeros**, e o *SMN2*, mais próximo aos **centrômeros**. Os genes *SMN1* e *SMN2* são **parálogos**, resultantes de eventos de duplicação e inversão de um gene ancestral. Estes genes têm sequências muito similares e codificam proteína de sobrevivência do neurônio motor (SMN). Apesar disso, apenas as mutações no gene *SMN1* são as responsáveis pelo desenvolvimento de uma doença chamada Atrofia Muscular Espinhal (AME).

Ambos os genes possuem nove **éxons** que são denominados 1, 2a, 2b e 3-8. O **splicing** alternativo do pré-RNA mensageiro do gene *SMN1* gera 11 transcritos diferentes e apenas 6 isoformas proteicas. No caso do gene *SMN2*, são gerados 16 transcritos, com 8 **isoformas proteicas**. As diferentes isoformas proteicas codificadas por ambos os genes, possuem entre 227 e 294 aminoácidos (Figura 1). O gene *SMN1* é responsável pela produção de mais de 70% dos produtos proteicos funcionais, enquanto o *SMN2* produz uma menor parte e a maior parte da necessidade é suprida pela presença do gene *SMN1*.

A similaridade entre os genes é extremamente alta. As diferenças entre eles consistem em apenas cinco bases nitrogenadas dispostas da seguinte forma: uma no **íntron** 6, uma no éxon 7, duas no íntron 7 e uma no éxon 8. Contudo nos transcritos de ambos os genes, existe um códon que sinaliza o término da tradução (*stop codon*) no éxon 7, limitando as diferenças em relação à região traduzida para apenas um códon (Figura 2).

A substituição no éxon 7 é a mais importante. A alteração nucleotídica no éxon 8 também é transcrita e incorporada no RNAm maduro, no entanto, não afeta a tradução da proteína, pois o códon de parada para a tradução está localizado no éxon 7. A troca de nucleotídeos no éxon 7 é de uma citosina (C), presente no gene *SMN1*, por uma timina (T) no *SMN2*, porém, tal diferença não altera o aminoácido codificado.

No gene *SMN2*, a mutação no éxon 7 influencia na taxa de produção de proteína funcional e, além de a produção proteica oriunda desse gene já ser menor do que a do *SMN1*, a substituição afeta o *splicing* do RNAm e, como resultado, a maior parte de SMN codificada por esse gene é degradada, pois trata-se de uma **proteína truncada**. Assim, uma pequena porcentagem de proteína SMN produzida pelo *SMN2* é realmente aproveitada, conforme será explicado no item "Mutações nos genes *SMN* e suas consequências na produção proteica".

Genes parálogos - são genes presentes em uma mesma espécie, resultantes de um evento de duplicação gênica. Assim sendo, as sequências nucleotídicas de ambos são idênticas, no momento da duplicação, mas podem divergir com o tempo devido ao acúmulo de diferentes mutações.

Éxon - Segmento que permanece no RNAm maduro após *splicing* do pré-RNAm.

Íntron - Sequências nucleotídicas que são removidas pelo processo de *splicing* do RNAm e não estão presentes em um RNAm maduro. Logo, não participam do processo de síntese de proteína.

Proteína truncada - Proteína encurtada em decorrência do aparecimento de um códon de parada prematuro na sequência nucleotídica de um gene.

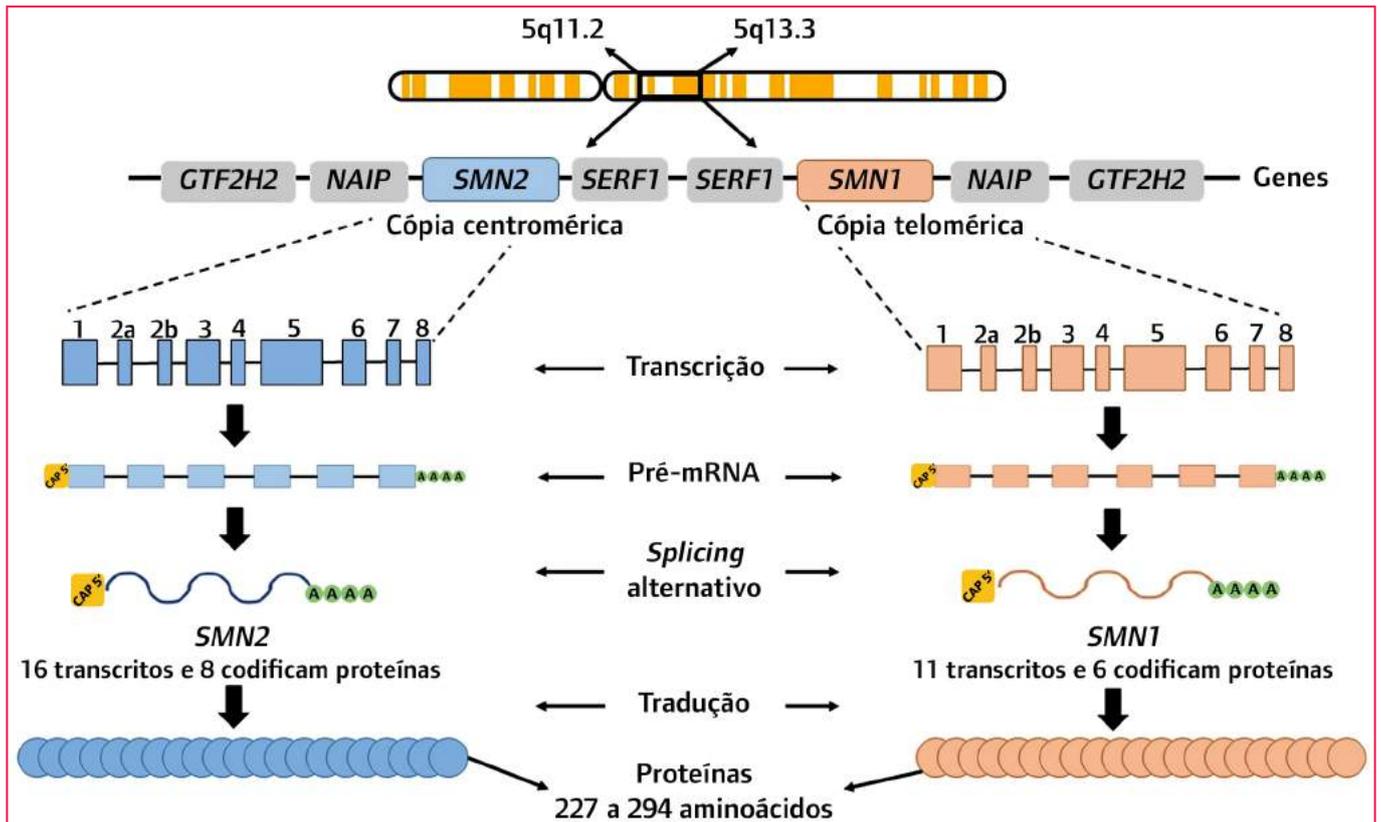


Figura 1.

Esquema representativo da região do cromossomo 5 que contém os genes *SMN1* e *SMN2*, incluindo a representação dos transcritos e produtos proteicos. Os genes *SMN* são parálogos e estão localizados no braço longo do cromossomo 5, em uma região duplicada e invertida. Os outros genes dessa região cromossômica estão representados pelas caixas cinzas. Ambos os genes *SMN* apresentam 9 exons, ilustrados pelas caixas em azul e rosa, enquanto os íntrons são representados pelas linhas em preto nessa mesma estrutura, sem correspondência com seu número real. O *splicing* alternativo do pré-RNA mensageiro origina 11 transcritos diferentes para o gene *SMN1* e 16 para o *SMN2*, cuja tradução resulta em, respectivamente, 6 e 8 isoformas proteicas funcionais. As proteínas produzidas pelos dois genes possuem entre 227 e 294 resíduos de aminoácidos.

De modo geral, tais mutações são importantes, pois auxiliam os pesquisadores a diferenciarem os dois genes. As constantes pesquisas em torno desses genes também foram importantes para o direcionamento contínuo de avanços e melhorias em testes diagnósticos e desenvolvimento de tratamentos farmacológicos, como os disponíveis atualmente.

A proteína SMN é o produto da tradução dos genes *SMN*. É expressa em todas as células, mas apresenta níveis elevados nos neurônios motores espinhais e é encontrada no citoplasma e no núcleo. No núcleo, a proteína SMN funciona como um complexo multiproteico, o complexo SMN, que atua na estruturação e regulação da estabilidade das **pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNP)**, uma classe de proteínas extremamente importantes na constituição do **spliceossomo** e na sua ação no pré-mRNA.

Ainda não se sabe a função exata da proteína SMN nos neurônios motores e nem como ela atua sobre eles. Evidências relatam alta expressão dessa proteína em axônios e dendritos e sugerem que esteja envolvida com o transporte de RNA ao longo de toda a estrutura neuronal. Sabe-se, no entanto, que tal proteína é importante para a manutenção desses neurônios pois sua ausência leva à morte neuronal, e os afetados pela AME vão, pouco a pouco, percebendo os sinais e sintomas da doença. Dependendo da forma de AME desenvolvida, o déficit proteico pode levar ao óbito.

snRNP - pequenas ribonucleoproteínas nucleares, ou seja, pequenas partículas compostas por pequenos RNA nucleares e proteínas.

Spliceossomo - Complexo formado por pequenos RNAs nucleares e proteínas que atuam na remoção dos íntrons no *splicing* do pré-RNA mensageiro.

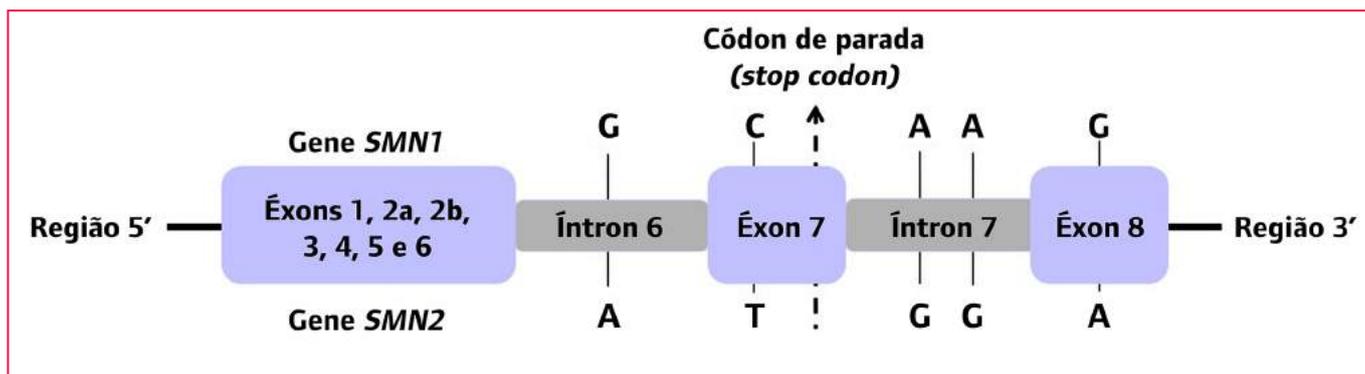


Figura 2.

Esquema ilustrativo das diferenças nas sequências nucleotídicas entre os genes *SMN1* e *SMN2*. A maioria das diferenças ocorrem em regiões intrônicas. Existem duas substituições que ocorreram nos éxons 7 e 8. No entanto, o códon de parada para a tradução de ambos os genes está no éxon 7. Assim, a única mutação em região codificadora ocorreu nesse éxon, que, apesar de não alterar o aminoácido a ser incorporado na tradução, interfere no processamento do RNA mensageiro.

Atrofia Muscular Espinhal 5q

A AME 5q é um distúrbio neuromuscular degenerativo genético caracterizado pela perda dos neurônios motores da medula espinhal e do tronco cerebral, causando atrofia dos músculos esqueléticos prejudicando os movimentos. Ocorre devido a mutações no gene *SMN1*, na região cromossômica 5q11.2-13.3. As mutações, na maioria dos casos de AME são decorrentes da deleção bialélica do éxon 7, mas outras mutações, apesar de mais raras, podem ocorrer, como está melhor explicado no tópico a seguir (Mutações nos genes *SMN* e suas consequências na produção proteica). A doença possui um padrão de **herança autossômica recessiva**, com incidência aproximada de 1 a cada 6 a 10 mil nascidos vivos, sendo a causa herdada mais comum de morte infantil. Por ser uma doença autossômica, afeta ambos os sexos de forma igual.

Os sintomas da doença são decorrentes da degeneração progressiva dos neurônios motores. Esses neurônios são responsáveis por conduzir impulsos nervosos para os músculos e a degeneração neuronal causa fraqueza e atrofia muscular (Figura 3). Os músculos proximais são mais afetados do que os músculos distais e os membros inferiores possuem menos força muscular do que os superiores. Contudo, os **fenótipos** da doença variam.

A AME pode ser classificada em cinco subtipos, sendo esses do tipo 0 ao IV, que diferem de acordo com a função motora máxima alcançada e idade de início dos sintomas. O diagnóstico de AME é molecular, no entanto, é a avaliação clínica que define o subtipo da doença. Nesse sentido, marcos motores como, por exemplo, engatinhar, sentar ou ficar de pé sem apoio são importantes para a avaliação clínica. Alguns subtipos iniciam-se na infância (AME infantil) enquanto outros iniciam seus sintomas em indivíduos na vida adulta também.

Os tipos 0 e I são os mais graves da doença. A doença do tipo 0 tem início pré-natal (também chamada de AME pré-natal) e é caracterizada por uma fraqueza grave e hipotonia, que é a perda da força muscular. A insuficiência respiratória é um sintoma crítico e a expectativa de vida é reduzida, pois a maioria dos afetados não atinge os 6 meses de idade.

O tipo I, também denominado de doença de Werdnig-Hoffmann, é o mais comum, atingindo até 60% dos indivíduos com a patologia. Atinge bebês entre 0 a 6 meses, que também apresentam hipotonia. O controle da cabeça está comprometido, podendo até estar ausentes. Durante o curso da doença há o enfraquecimento da face, da língua e dos músculos da faringe. Apesar da expectativa de vida ser reduzida devido ao curso natural da doença, com a aplicação de tratamentos multidisciplinares e farmacológicos, existem relatos de crianças com AME tipo I que chegaram à segunda década de vida.

Doença autossômica

recessiva - Caracterizada pelo acometimento tanto de homens quanto de mulheres na mesma proporção (pois o gene alterado não se encontra em cromossomos sexuais), sendo necessária a presença de um alelo recessivo mutado, um herdado do pai e um herdado da mãe, para que a doença se manifeste.

Fenótipo - Conjunto das características de um indivíduo, resultado da interação do genótipo com o meio ambiente.

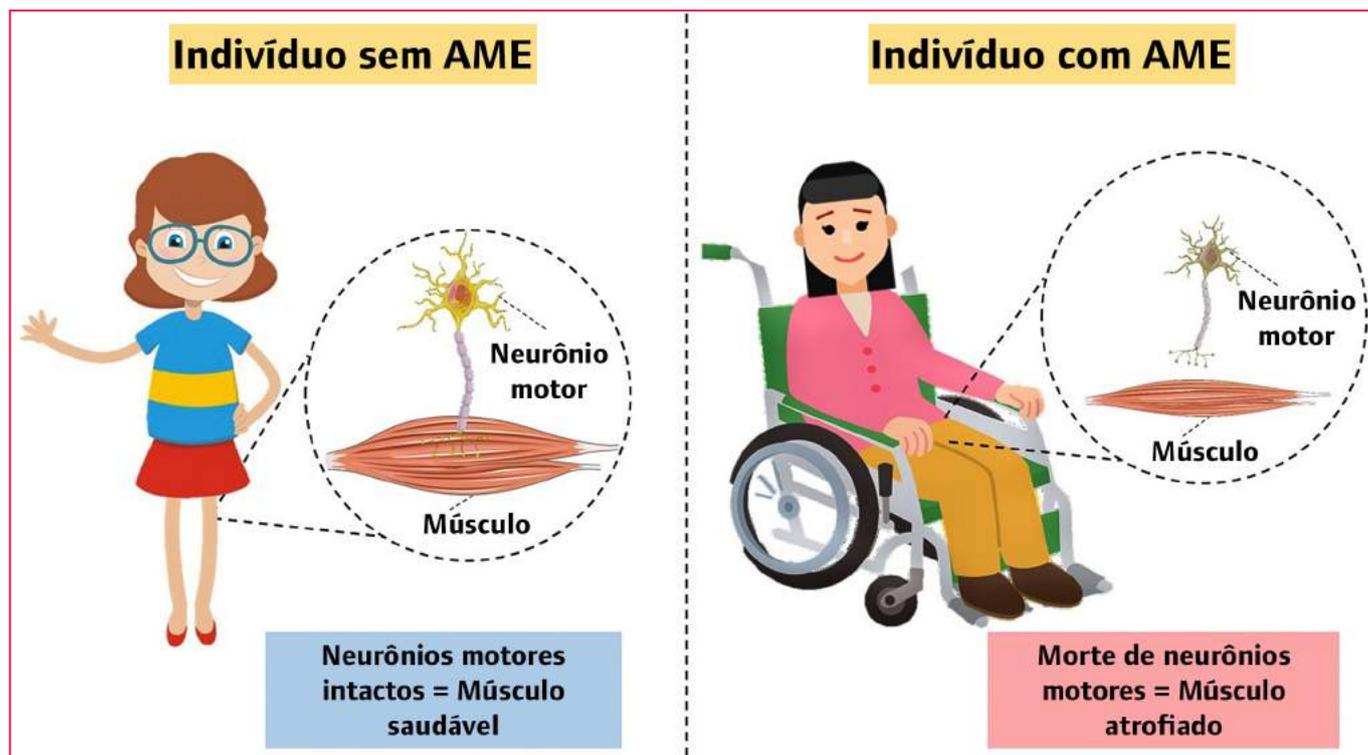


Figura 3.

A Atrofia Muscular Espinhal é uma doença neuromuscular degenerativa. A deficiência na produção da proteína SMN induz a morte de neurônios motores. Os neurônios motores conduzem impulsos elétricos que resultam na movimentação dos músculos. A morte dessas células causa a atrofia muscular, que é a diminuição do tamanho/volume dos músculos, decorrente da falta de estímulos contráteis.

O tipo II (ou doença de Dubowitz) é considerado intermediário quanto à sua gravidade. As crianças com o tipo II são capazes de sentar sem ajuda, mas não conseguem andar independentemente. Essa é segunda forma mais comum de AME e os sintomas surgem entre 07 e 18 meses. Apresentam uma fraqueza progressiva maior nas pernas do que nos braços. Algumas crianças podem desenvolver uma doença pulmonar restritiva devido à fraqueza muscular intercostal e escoliose.

No tipo III (ou doença de Kugelberg-Welander), considerado moderado, os sintomas são bem heterogêneos e os pacientes conseguem andar sem ajuda durante algum momento de sua vida, porém, alguns podem precisar de cadeira de rodas. A manifestação desse subtipo ocorre após 18 meses e os indivíduos possuem uma sobrevida normal.

Pacientes com AME tipo III também podem desenvolver escoliose, inclusive após perderem a marcha. Geralmente apresentam pouca ou nenhuma fraqueza nos músculos respiratórios.

Mutações de ponto - São mutações que afetam um ou poucos nucleotídeos em uma sequência nucleotídica.

Por sua vez, o tipo IV (ou AME tardia) é a forma mais rara e mais leve da doença. O quadro clínico é mais leve que o tipo III, com progressão normalmente mais lenta. Seu início ocorre na idade adulta, aproximadamente aos 30 anos, podendo ser juvenil e a expectativa de vida é normal.

Mutações nos genes SMN e suas consequências na produção proteica

Como visto, as cópias teloméricas e centroméricas do gene *SMN* são quase idênticas e codificam a mesma proteína. Todavia, o desenvolvimento da AME é determinado pela deleção total ou por **mutações de ponto** na cópia telomérica do gene, ou seja, o *SMN1*, enquanto a gravidade da doença é determinada pelo número de cópias do gene *SMN2*, atuando como um modificador do curso da doença, ainda que sua produção proteica seja menor.

Deleção homozigótica -

Deleção das duas cópias alélicas de um gene, sendo uma cópia de origem materna, e a outra, paterna.

Conversão gênica -

Mecanismo molecular por meio do qual um gene ou parte de sua sequência gênica é substituída por outra sequência ou outra cópia de um gene, sem que ocorra uma recombinação homóloga.

Lócus - Região do cromossomo onde um gene está localizado.

Supressor exônico de *splicing* (ESS)

- Sequência que inibe a ligação do spliceossomo aos íntrons no pré-RNA transcrito levando à deleção do éxon no RNAm maduro.

Aproximadamente 95-98% dos casos de AME ocorrem por **deleção homozigótica** do éxon 7 no gene *SMN1*. Em apenas 2-5% dos casos ocorrem mutações de ponto nesse gene e/ou mesmo sua deleção em um dos **alelos**. A deleção do *SMN1* também pode ocorrer devido a um mecanismo chamado **conversão gênica**, por meio do qual o gene *SMN1* converte-se em sua cópia homóloga, o *SMN2*. Os eventos de conversão gênica estão relacionados com fenótipos mais brandos da doença por aumentar as cópias do gene centromérico, o *SMN2*.

Mutações em apenas um dos dois alelos para o gene *SMN1* caracterizam o indivíduo como **heterozigótico**, em relação à doença. A maior parte das mutações nesse gene já identificadas correspondem às do tipo **missense** e assim também influenciam na produção da proteína SMN. Vale ressaltar que o **lócus** de ambos os genes é propenso a recombinações, o que é relacionado à alta homologia da região. Dessa forma, os genes nessa localização exibem altas taxas de mutações novas, como deleções e duplicações. Esse é um mecanismo molecular que facilita o desenvolvimento da AME.

O gene *SMN1* é responsável pela maior parte da síntese proteica de SMN, enquanto o *SMN2* é responsável por codificar entre 10 e 25% da proteína funcional. Os 75% restantes são de transcritos sem o éxon 7, denotados por (*SMN Δ 7*). Esses transcritos resultam em proteína truncada conforme já explicado. A presença do éxon 7 em ambos os genes é extremamente importante para a produção de uma proteína funcional e a sua deleção pode ocorrer tanto em *SMN1*, e assim ser responsável por causar a AME, quanto em *SMN2* (Figura 4). A ausência do éxon 7 no *SMN2* deve-se à alteração de bases nitrogenadas entre as sequências dos dois genes.

Apesar da substituição nucleotídica de C em *SMN1*, para T em *SMN2* não acarretar em uma troca de aminoácido, ela interfere no *splicing* de seu pré-RNAm, atuando como um **supressor exônico de *splicing* (ESS)**. Assim, a presença de T no éxon 7 do gene *SMN2* faz com que esse éxon seja deixado de fora do RNAm. De forma oposta, o nucleotídeo C em *SMN1* atua como o **amplificador exônico de *splicing* (ESE)**, e permite a inclusão do mesmo éxon em seu RNAm.

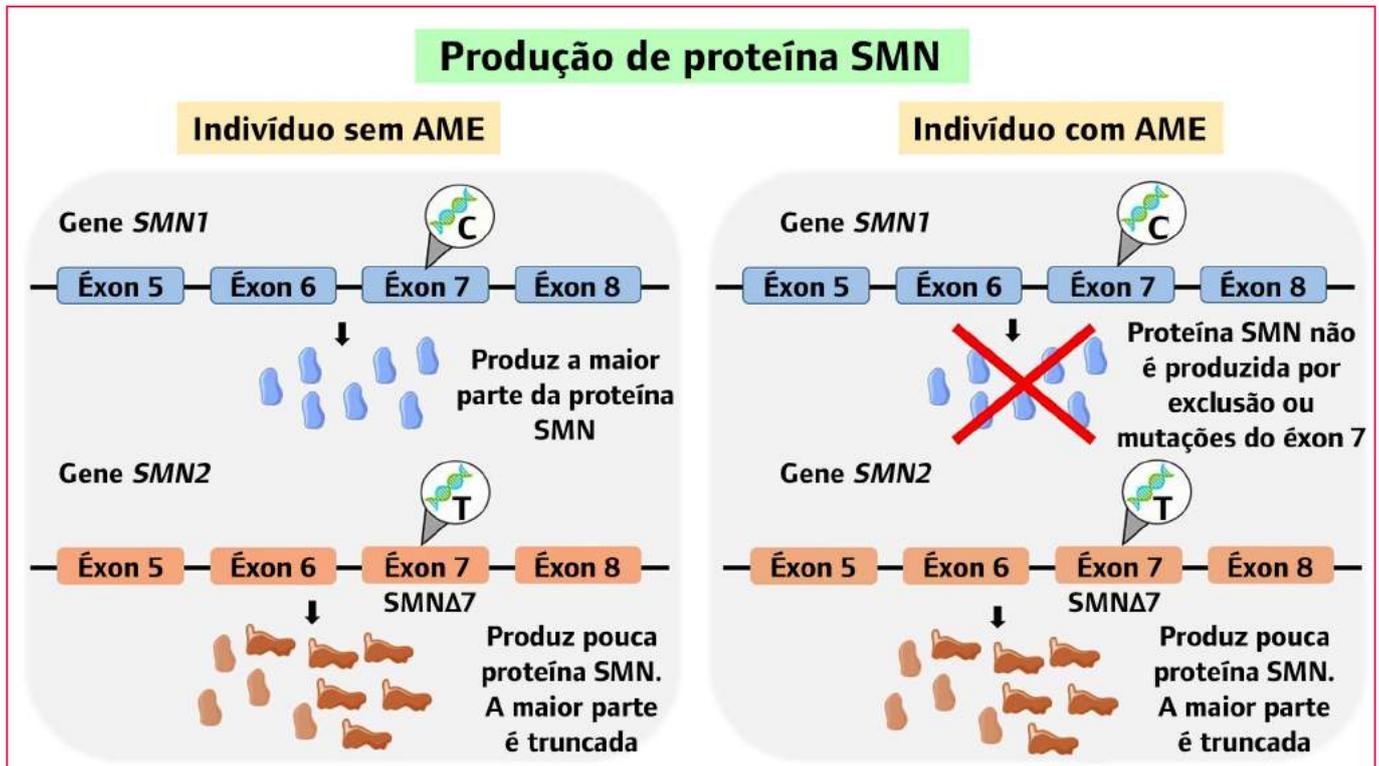
Embora os transcritos de *SMN2* sem o éxon 7 sejam traduzidos, a proteína SMN produzida é truncada e instável, sendo rapidamente degradada. Postula-se que esse éxon codifique domínios importantes para o dobramento proteico. Portanto, esse gene confere uma baixa produção de níveis da proteína funcional do SMN e modula o fenótipo da AME. Entretanto, a ausência não implica em alterações clínicas e também acontece em pessoas que não possuem a doença. Além disso, a alteração nucleotídica de C, em *SMN1*, para T, em *SMN2*, está presente em todos os indivíduos, apresentando doença ou não.

Alelos - São formas alternativas de um mesmo gene que ocupam o mesmo lócus em cromossomos homólogos.

Heterozigótico - Indivíduo que possui alterações de sequência em um único alelo do gene, ou seja, tem dois alelos com sequências nucleotídicas diferentes.

Mutações missense ou de sentido errado - São mutações que acarretam substituições na sequência das bases nitrogenadas no DNA e que resultam na presença de um aminoácido diferente do que normalmente seria incorporado no polipeptídeo, no processo de síntese de proteínas.

Amplificador exônico de *splicing* (ESE) - sequência que dirige o spliceossomo para sítios de *splicing* localizados nas extremidades dos éxons.

**Figura 4.**

Esquema ilustrativo da produção de proteína SMN. Em um indivíduo sem a doença, o gene *SMN1* é capaz de produzir toda a proteína SMN necessária para a manutenção de neurônios motores. Se a pessoa for heterozigótica com o gene mutado em um dos alelos, ela terá uma diminuição da produção de proteína, mas não desenvolverá a doença. Em um indivíduo com AME, ocorre a ausência de produção de proteína SMN, originada a partir de *SMN1*. No caso do gene *SMN2*, tanto indivíduos com a doença, quanto indivíduos sem a AME possuem a substituição de C para T no genoma. Isso implica em níveis menores da proteína para ambos os casos, pois essa alteração afeta o *splicing*, levando à exclusão do éxon 7 no RNA mensageiro maduro. A maior parte dos transcritos do *SMN2* não incluem o éxon 7 e, portanto, são traduzidos em proteínas truncadas, e assim, serão degradadas.

O gene *SMN2* é uma exceção quanto ao número de genes que herdamos de nossos pais. Sempre recebemos duas cópias de cada gene, uma de cada genitor. No entanto, esse gene pode estar presente em mais de duas cópias por conjunto cromossômico, e podemos ter em nosso genoma até oito cópias. O número de cópias genômicas do *SMN2* correlaciona-se inversamente à gravidade da doença, ou seja, quanto mais cópias, mais proteína SMN funcional é produzida, e assim menor é a gravidade da doença, caso haja seu desenvolvimento. A maioria dos bebês gravemente afetados herdaram apenas duas cópias do *SMN2*, enquanto aqueles indivíduos com formas mais leves da doença têm três ou quatro cópias.

Devido ao padrão de herança recessiva da AME, são necessárias mutações nas duas

cópias do gene *SMN1* para que o indivíduo desenvolva a doença (Figura 5). A mutação em apenas uma cópia do gene não leva ao desenvolvimento da doença mas pode significar um risco genético e levar o indivíduo a recorrer a um serviço de aconselhamento genético, pois a união com uma pessoa que também possua uma cópia mutada do gene resulta na probabilidade de 25% de terem um filho com AME em cada gestação.

Estima-se que aproximadamente uma a cada 50 pessoas tenham uma cópia mutada do gene *SMN1*. Além das mutações, pode ocorrer também a presença de duas cópias desse gene em um mesmo cromossomo. Novamente, esse indivíduo terá ausência de sintomas, porém possui 50% de chances de repassar o cromossomo com deleção para os seus filhos. O diagnóstico da AME é mo-

lecular, realizado pelo método padrão ouro chamado de Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação (MLPA), mas a técnica de **Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (q-PCR)** tam-

bém pode ser utilizada na quantificação do número de cópias dos genes *SMN*. Adicionalmente, sequenciamentos gênicos podem ser solicitados para identificar as mutações menores, como as de ponto.

q-PCR - é uma variação da técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), na qual o resultado da amplificação da sequência de interesse é visualizada em tempo real e com capacidade de gerar resultados quantitativos com maior precisão.

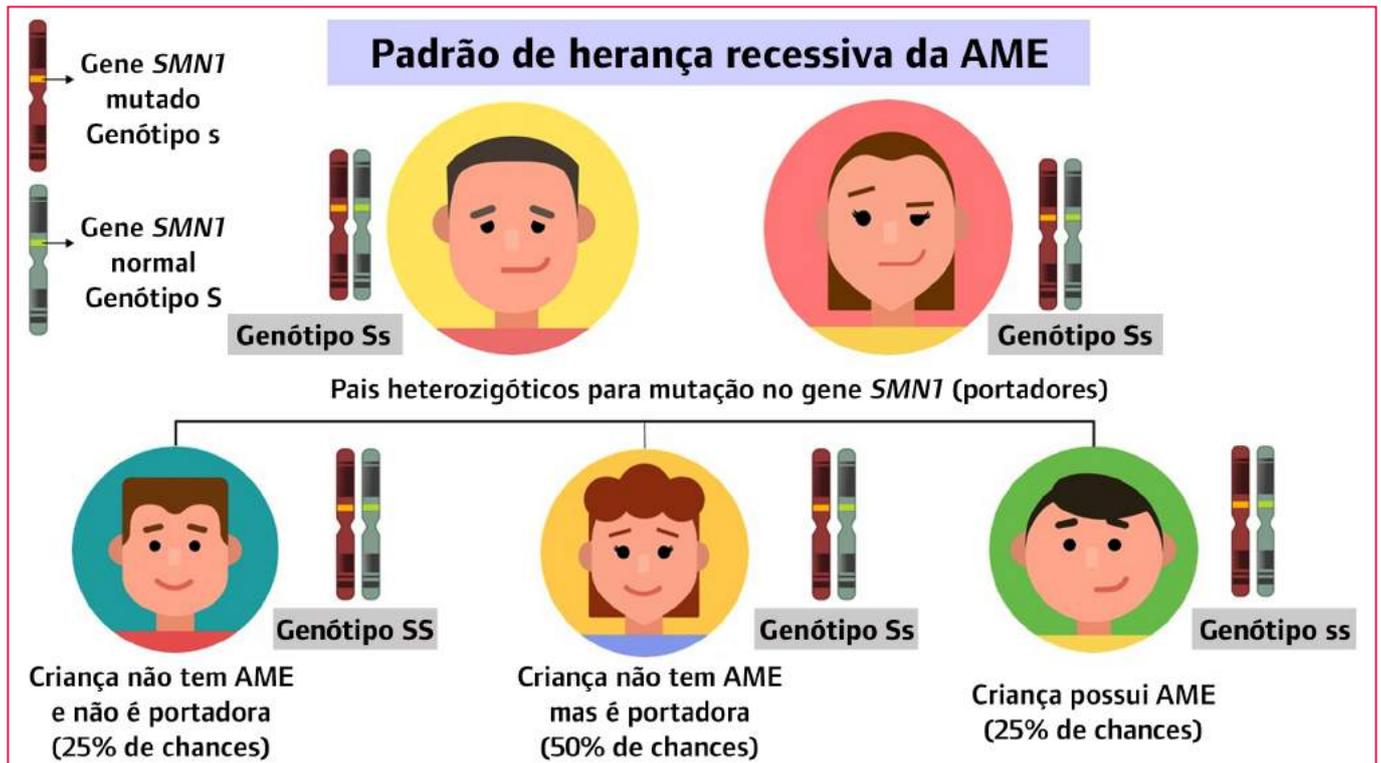


Figura 5. Esquema representativo do padrão de herança autossômico recessivo para a Atrofia Muscular Espinhal. Pais heterozigóticos com mutações nos genes *SMN1* não desenvolvem a doença, porém possuem 25% de possibilidade de, a cada gestação, gerarem uma criança com AME. Além disso, há 50% de chances de terem um filho portador da mutação, o que possibilita transmitir essas mutações para as próximas gerações e colaborar com a alta incidência da doença. Como a maioria dos casais descobrem essas mutações após o nascimento de um filho com AME, o aconselhamento genético no caso de uma nova gestação é de extrema importância.

Considerações finais

A AME é uma doença de causa genética, sendo a principal causa herdada de morte infantil. É decorrente de mutações e/ou deleções no gene *SMN1*, que codifica a proteína de sobrevivência do neurônio motor. O número de cópias do gene *SMN2* influencia no fenótipo clínico da doença. Embora ainda

não haja cura, os avanços no tratamento têm mostrado resultados para os indivíduos com AME, incluindo a terapia gênica. A conduta atual é voltada para melhoria da qualidade e expectativa de vida dos pacientes, com cuidados de equipes multidisciplinares. Diante disso, ressalta-se a importância do aconselhamento genético às famílias, realizado por um geneticista/aconselhador genético, tendo em vista o risco de recorrência da doença na prole.



Para saber mais

BURGHES, A. H. M.; BEATTIE, C.E. SPINAL muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nature Reviews Neuroscience*, v. 10, n. 8, p. 597-609, 2009.

ENSEMBL - Gene *SMN1*. Disponível em: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000172062;r=5:70925030-70953942. Acesso em 22 out 2020.

ENSEMBL - Gene *SMN2*. Disponível em: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/

[Summary?db=core;g=ENSG00000205571;r=5:70049638-70078522](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/summary?db=core;g=ENSG00000205571;r=5:70049638-70078522). Acesso em 22 out 2020.

GeneCards - Gene *SMN1*. Disponível em: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SMN1&keywords=SMN>. Acesso em 22 out 2020

KASHIMA, T.; MANLEY, J. L. A negative element in *SMN2* exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nature genetics*, v. 34, n. 4, p. 460-463, 2003.

KOLB, S. J.; KISSEL, J. T. Spinal muscular atrophy. *Neurologic clinics*, v. 33, n. 4, p. 831-846, 2015.