



**Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO)**  
**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS**  
**Pós graduação de Biologia Celular e Molecular – PPGBMC**

**Análises *in silico* das mutações da proteína VCP humana  
associadas à Esclerose Lateral Amiotrófica e Demência  
Frontotemporal**

**Letícia Alves Ferreira**

**Rio de Janeiro**

**2021**

Letícia Alves Ferreira

Análise *in silico* das mutações da proteína VCP humana associadas à Esclerose Lateral Amiotrófica e Demência Frontotemporal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular (PPGBMC) da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em ciências da saúde.

**Área de concentração:** Biologia Molecular e Celular

**Orientadora:** Profa. Dra. Joelma Freire de Mesquita

Rio de Janeiro

2021

F383      Ferreira, Leticia Alves  
            Análises in silico das mutações da proteína VCP  
            humana associadas à Esclerose Lateral Amiotrófica e  
            Demência Frontotemporal / Leticia Alves Ferreira. --  
            Rio de Janeiro, 2021.  
            73f

            Orientadora: Joelma Freire de Mesquita.  
            Coorientador: Gabriel Rodrigues Coutinho Pereira.  
            Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do  
            Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação  
            em Biologia Molecular e Celular, 2021.

            1. Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). 2.  
            Demência Frontotemporal (DFT). 3. Proteína Contendo  
            Valosina (VCP). 4. Biologia Computacional. 5.  
            Alterações Genéticas. I. Mesquita, Joelma Freire de,  
            orient. II. Pereira, Gabriel Rodrigues Coutinho,  
            coorient. III. Título.

Letícia Alves Ferreira

Análise in silico das mutações da proteína VCP humana associadas à Esclerose Lateral Amiotrófica e demência Frontotemporal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular (PPGBMC) da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em ciências.

**Banca Examinadora**

1. Professora Joelma Freire de Mesquita Título: Doutora/UNIRIO
2. Professora Claudia Alessandra Aiub Título: Doutora/UNIRIO
3. Professor Carlos Fernando Araújo Lima de Oliveira Título: Doutor/UERJ
4. Nicole de Miranda Scherer Título: Doutora/INCA

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, por ter me ajudado a sobreviver nesse período difícil que foi 2020 em uma matéria totalmente inexplorada por mim antes, e que por muitas vezes recorri a fé para entender todos esses fenômenos na minha vida.

Agradeço aos meus familiares pela compreensão da minha ausência em casa e dos serviços domiciliares e terem lavado toda a louça quando eu precisava terminar a meta diária de artigos.

Agradeço a professora Dra. Joelma Freire de Mesquita por ter acreditado e me designar esse projeto maravilhoso que me mostrou novas possibilidades de campo de trabalho.

Agradeço ao M.Sc. Gabriel Rodrigues Coutinho Pereira por toda a paciência e dedicação comigo, além da cooperação com meus problemas técnicos durante as reuniões.

Agradeço também a todos do laboratório que nunca me negaram ajuda ou explicação quando precisava de rápidas ajudas.

Por fim, agradeço também aos professores da minha banca – tanto de qualificação quanto de defesa – Dr.<sup>a</sup> Claudia Alessandra Fortes Aiub e Dr. Carlos Fernando Araújo Lima de Oliveira – pelas escolhas de palavras ao me dar sugestões para aprimoramento do trabalho e pelas indicações de direções de vida para onde focar academicamente.

Eu sou eternamente grata a tudo que vivi e passei dentro da instituição, e por isso não posso deixar de agradecer à todos os professores e técnicos da UNIRIO, em especial a secretária do PPGBMC Diana que trabalhou a mil por hora para enviar todos os informes aos alunos durante a quarentena e me dando toda a atenção quando não entendia algum comunicado: Antes, durante e depois do processo de obtenção do título de mestrado.

## RESUMO

A ELA é uma doença neurodegenerativa progressiva e fatal, que afeta os neurônios motores levando ao óbito, geralmente, por insuficiência respiratória, cerca de 3 a 5 anos após o início dos sintomas. Já a demência frontotemporal (DFT) é uma doença neurodegenerativa de início pré-senil causada pela degeneração dos lobos frontal e temporal do cérebro, sendo caracterizada por distúrbios de personalidade, cognição e linguagem. A ELA e a demência frontotemporal (DFT) apresentam sobreposição clínica, genética e patológica, além de marcadores histopatológicos em comum, sugerindo que estas são duas extremidades no espectro de uma mesma doença. Dentre as principais causas associadas ao desenvolvimento de ELA e DFT, estão mutações na proteína VCP humana, uma proteína da família das AAA-ATPases que está envolvida em uma série de processos celulares essenciais, como: degradação de proteínas, apoptose, mitose e vias de reparo do DNA. Mutações na VCP resultam na disfunção da degradação proteica e da homeostase de cálcio, mecanismos centrais envolvidos na fisiopatologia da ELA e DFT. Esse trabalho tem como objetivo caracterizar utilizando simulações computacionais possíveis alterações estruturais e funcionais causadas de mutações da proteína VCP, seguindo a metodologia previamente estabelecida por nosso grupo. Foram compiladas 16 mutações da proteína VCP humana dos bancos de dados e literatura consultada. A análise de conservação evolutiva indicou que as mutações ocorrem majoritariamente em posições variáveis e de baixa conservação da VCP, e que os domínios D1 e D2 são majoritariamente conservados. A modelagem computacional gerou um modelo acurado e completo da VCP humana, inédito para a proteína. O alinhamento estrutural entre a VCP nativa e suas mutantes apontou para alterações estruturais sugestivas de implicações funcionais para a proteína, afetando sobretudo os domínios C-terminal e D2, o que poderia estar relacionado ao desenvolvimento de ELA e DFT. A caracterização de regiões proteicas potencialmente envolvidas no desenvolvimento de patologias utilizando bioinformática, auxilia na melhor compreensão das bases estruturais de doença, podendo guiar o desenho racional de fármacos baseado em estrutura, e ainda facilitar o desenvolvimento de novos tratamentos para a ELA.

**Palavras-Chaves:** Proteína Contendo Valosina (VCP), Biologia computacional, Mutações genéticas, Demência frontotemporal (DFT), Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA).

## ABSTRACT

ALS is a progressive and fatal neurodegenerative disorder that affects motor neurons, generally leading to death due to respiratory failure within 3 to 5 years after the symptoms' onset. Frontotemporal dementia (FTD) is a pre-senile neurodegenerative disease caused by the degeneration of the frontal and temporal lobes of the brain. FTD is characterized by disorders of personality, cognition, and language. ALS and frontotemporal dementia (FTD) present clinical, genetic, and pathological overlap, in addition to common histopathological markers, which suggest that they are two ends in the spectrum of the same disease. Mutations in the human VCP protein are among the main causes associated with the development of ALS and DFT. VCP is a protein from the AAA-ATPase family involved in a series of essential cellular processes, including protein degradation, apoptosis, mitosis, and DNA repair pathways. VCP mutations result in dysfunctions of protein degradation and calcium homeostasis, which are central mechanisms involved in the pathophysiology of ALS and DFT. This work aims to characterize *in silico* possible structural and functional alterations caused by mutations in the VCP protein, following the methodology previously described by our group. Sixteen VCP mutations were compiled from the literature and databases consulted. Evolutionary conservation analysis indicated that these mutations mostly occur in variable and average conserved positions of VCP. D1 and D2 domains were the most conserved among the functional domains of VCP. Computational modeling generated an accurate and complete model of human VCP, which is unprecedented for the protein. The structural alignment between VCP wild-type and mutants pointed to structural alterations suggestive of functional implications for the protein, mainly affecting the C-terminal and D2 domains. These alterations could be related to the development of ALS and DFT. The *in silico* characterization of protein regions potentially involved in the development of pathologies leads to a better understanding of the structural bases of the disease. This approach may guide the rational drug design based on protein structure and facilitates the development of new treatments for ALS.



**Keywords:** Valosine-Containing Protein (VCP), Computational Biology, Genetic Mutations, Frontotemporal Dementia (DFT), Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS).

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 A esclerose lateral amiotrófica e demência frontotemporal .....	1
1.2 A valosin-contain protein (VCP).....	4
1.3 Fisiopatologia da ELA/DFT-VCP. ....	6
1.4 Mutações da proteína VCP. ....	8
1.5 Tratamentos para a ELA e DFT .....	14
1.6 Análise <i>in silico</i> .....	16
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivos gerais .....	17
2.2 Objetivos específicos .....	17
3. METODOLOGIA .....	17
2.1 Obtenção da sequência, estrutura e compilação das variantes .....	18
2.2 Análise de predição do efeito das mutações .....	18
2.3 Modelagem estrutural e validação da proteína VCP nativa.....	19
2.4 Análise de conservação evolutiva.....	21
2.5 Modelagem estrutural das variantes .....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	22
2.1 Obtenção da sequência, estrutura e compilação das variantes .....	22
2.2 Análise de predição do efeito das mutações.....	24
2.3 Modelagem estrutural da proteína nativa .....	30
2.4 Análise de conservação evolutiva .....	38
2.5 Modelagem estrutural das variantes .....	42
5. CONCLUSÃO .....	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

## Lista de Ilustrações

<b>Figura. 1:</b> Estrutura tridimensional da proteína VCP human .....	14
<b>Figura. 2:</b> Representação esquemática da proteína VCP humana. ....	22
<b>Figura. 3:</b> Predição funcional das variantes da VCP por algoritmo utilizado.....	25
<b>Figura. 4:</b> Predição funcional de cada uma das mutações da VCP. ....	26
<b>Figura. 5:</b> Porcentagem de variantes preditas como deletérias por 0 a 10 algoritmos.....	27
<b>Figura.6:</b> Predição de agregação proteica (TANGO), propensão amiloide (WALTZ) e tendência de ligação à chaperonas (LIMBO) para as variantes da VCP.....	28
<b>Figura 7.</b> Predição de estabilidade para as variantes da VCP.....	29
<b>Figura 8.</b> Validação do modelo teórico da VCP no PROCHECK e ERRAT.....	33
<b>Figura 9.</b> Validação do modelo teórico da VCP no ProSa e QMEAN.....	35
<b>Figura 10.</b> Validação do modelo teórico da VCP no ProSa e QMEAN .....	36
<b>Figura 11.</b> Alinhamento estrutural do modelo validado da VCP (rosa) com a estrutura experimental 5FTK (verde) .....	37
<b>Figura 12.</b> Modelo teórico validado da proteína VCP humana .....	38
<b>Figura 13.</b> Análise de conservação da proteína VCP no ConSurf.....	39
<b>Figura 14.</b> Conservação evolutiva da VCP por domínio.....	41
<b>Figura 15.</b> Alinhamento estrutural da VCP nativa e variantes R95G, G97E, I126F, R155C, R155H, R155L, e R155P no TM-align.....	44
<b>Figura 16.</b> Alinhamento estrutural da VCP nativa e variantes R155P, R155S, R159G, R159H, E185K, e R191Q no TM-align.....	45
<b>Figura 17.</b> Alinhamento estrutural da VCP nativa e variantes L198W, A232E, N387H e D592N no TM-align.....	46

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Tabela de mutação e frequência alélica encontradas na população de mais de 250 mil indivíduos.....	10
<b>Tabela 2:</b> Propriedades físico-químicas das substituições de aminoácidos decorrentes das mutações da proteína VCP humana.....	22
<b>Tabela 3.</b> Modelagem estrutural da proteína VCP.....	30
<b>Tabela 4.</b> Alinhamento estrutural dos modelos computacionais da VCP nativa e o fragmento 5FTK do PDB.....	31
<b>Tabela 5.</b> Validação estrutural dos modelos computacionais da VCP nativa.....	32
<b>Tabela 6:</b> Análise da conservação evolutiva no ConSurf.....	40
<b>Tabela 7.</b> Alinhamento estrutural da VCP nativa e suas variantes no TM-align .....	42

## Lista de Abreviaturas e Siglas

<b>ELA:</b> Esclerose Lateral Amiotrófica.....	1
<b>TDP-43:</b> proteína de ligação ao RNA .....	1
<b>MND:</b> Doenças do neurônio motor. ....	2
<b>SUS:</b> Sistema Único de Saúde.....	2
<b>DFT:</b> Demência frontotemporal na doença de Paget e demência frontotemporal .....	2
<b>IBMPFD:</b> Miopatia com corpos de inclusão.....	3
<b>VCP:</b> Proteína Contendo Valosina .....	4
<b>AAA-ATPases:</b> Adenosina Trifosfatada do tipo II.....	4

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Esclerose Lateral Amiotrófica e Demência frontotemporal

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) - do inglês “*amyotrophic lateral sclerosis*” – também conhecida como a Doença de Lou Gehrig (HARDIMAN; VAN DEN BERG; KIERNAN, 2011) – descrita pela primeira vez em 1869 por Jean-Martin Charcot, (REDLER; DOKHOLYAN, 2012, PADHI *et al.*, 2014) como uma cicatriz ou endurecimento dos tecidos na medula espinhal lateral (GRAD *et al.*, 2017). A ELA é uma doença neurodegenerativa progressiva e fatal, que afeta os neurônios motores superiores e inferiores do cérebro e medula espinhal. A doença leva ao óbito, geralmente, por paralisia e/ou insuficiência respiratória, cerca de 3 a 5 anos a partir do início dos sintomas (JOHNSON *et al.*, 2010; BEGHI *et al.*, 2006).

As principais características neuropatológicas da ELA são os: I) trato corticoespinhal pálido, devido à perda de neurônios motores; II) presença de inclusões de proteínas ubiquitinizadas nos neurônios motores sobreviventes; III) deposição de agregados de TDP-43 (proteína de ligação ao RNA que exibe funções nucleares e citoplasmáticas), que também parece estar envolvido em eventos do RNA, assim como em várias outras funções metabólicas do RNA que na presença de inclusões citoplasmáticas e intranucleares pode produzir a toxicidade neuronal por meio de algum ganho de função ou por meio da interrupção das funções fisiológicas do TDP-43 no núcleo celular das células basais (ASH *et al.*, 2019; JOHNSON *et al.*, 2010; NEUMANN *et al.*, 2006); IV) gliose reativa, que corresponde à hipertrofia de células gliais no córtex motor e medula espinhal nas áreas de degeneração (GRAD *et al.*, 2017); V) degeneração frontotemporal associada à presença de inclusões TDP-43 (S. SPINA ET AL, 2013).

10% de todos os casos de ELA são do tipo familiar, associados a mutações em 20 genes, dentre eles: ALS, SOD1, TARDBP, FUS, OPTN, VCP, UBQLN2, C9ORF72 e PFN1 (BONDUELLE, 1982; RENTON; CHIÒ; TRAYNOR, 2014) enquanto que cerca de 90% dos casos são do tipo

esporádico (GRAD *et al.*, 2017; HAVERKAMP; APPEL; APPEL, 1995; TIRYAKI; HORAK, 2014), sem origem hereditária conhecida (YAMASHITA; ANDO, 2015), e podendo estar envolvido os seguintes fatores ambientais: I) Exercício físico exacerbado (FACCHINETTI; ORSINI; LIMA, 2009), metais pesados, tabagismo, dieta, serviço militar e a exposição a herbicidas/pesticidas (ASH *et al.*, 2019).

Os dados globais de ELA apontaram para uma prevalência de 4,42 em 1.00.000 habitantes e incidência de 1,59 em 1.00.000 por ano (XU *et al.*, 2020), sendo considerada a forma mais comum de Doenças do Neurônio Motor (do inglês – “*motor neuron diseases*”, MND) em adultos (MANCUSO; NAVARRO, 2015). Entretanto, existem variações pontuais na taxa de incidência (aumento) em algumas regiões, como na ilha de Guam, em Nova Guiné ocidental, e na península de Kii no Japão. O consumo de um aminoácido neurotóxico contido nas sementes de *Cycas micronesica*, um fruto nativo da micronésia, poderia estar relacionados às elevadas taxas de prevalência de ELA nessas regiões (ZAREI *et al.*, 2015). Na América do Sul e no Brasil, poucos estudos epidemiológicos foram realizados até o momento, mas estes sugerem que as taxas de incidência sejam similares às encontradas na América do Norte e Europa (MOURA; CASULARI; CARVALHO GARBI NOVAES, 2016; ZAREI *et al.*, 2015). Também foram vistas variações na taxa de incidência em veteranos de guerra, como a do Golfo, que apresentaram um risco relativo de 1,5 vezes maior do que aos homens que não serviram. A exposição a gases neurotóxicos, tal qual a experienciada por veteranos da guerra do golfo é considerado fator de risco para a ELA. Além disso, a exposição a outros fatores de risco ambiental, como choques, atividade física exacerbada e maior estresse oxidativo nesses indivíduos também poderiam influenciar no desenvolvimento da doença (ALLARD, 2013; CLEMENTINO, [Associação Pró-Cura pela Ela]; FGA; LIMA; ALVARENGA, 2009).

No Brasil, observa-se uma predominância masculina e em caucasianos entre os afetados, além da frequência de mortalidade de 91% de 8.942 em pacientes com causa de morte por doenças neuro motoras. A ELA possui incidência de 0,61 a 0,89 e dentre os maiores de 20 anos e em maiores de 45 anos está entre 1,77 a 2,3 por 100000 habitantes (MOURA; CASULARI;

CARVALHO GARBI NOVAES, 2016), e possui prevalência de 1,5 em 100.000 habitantes (PEREIRA, Roberto Dias Batista, 2006). Para dados atualizados no país, no sistema público de saúde (SUS) do Brasil, o diagnóstico precoce da ELA pode sofrer devido a infraestrutura e devido também a problemas socioeconômicos que pode influenciar negativamente nos desfechos clínicos (FÁVERO *et al.*, 2017).

A ELA e a demência frontotemporal (DFT) apresentam sobreposição clínica, genética e patológica, além de marcadores histopatológicos em comum. Essas evidências sugerem que a DFT e a ELA são duas extremidades no espectro de uma mesma doença, que podem cursar com casos puros de ELA e/ou DFT, além de casos intermediários que envolvam distúrbios cognitivos, de linguagem e comportamentais típicos de DFT, e distúrbios de neurônios motores característicos de ELA (VAN ES *et al.*, 2017).

A DFT, por sua vez, é uma doença neurodegenerativa heterogênea progressiva e fatal de início pré-senil causada pela degeneração dos lobos frontal e temporal do cérebro. Como resultado da degeneração dessas regiões cerebrais, o paciente cursa com distúrbios relacionados à motivação, personalidade, cognição, atenção e linguagem (BOTT *et al.*, 2014; ONYIKE; DIEHL-SCHMID, 2013). A DFT é a segunda maior causa de demências pré-senil, estando presente em cerca de 26% de todos os casos (BANG; SPINA; MILLER, 2015). A prevalência global estimada para a DFT é de 15 por 100.000 e a incidência é de cerca de 2,7-4,1 por 100.000 ao ano (ONYIKE; DIEHL-SCHMID, 2013; PIGUET *et al.*, 2011).

A DFT pode ser subdividida em familiar ou esporádica, sendo cerca de 60% dos casos esporádicos e 40% familiares, o que sugere uma forte contribuição genética (BANG; SPINA; MILLER, 2015). Dentre os fatores ambientais associados ao desenvolvimento de DFT esporádica, estão traumas na cabeça e doenças na tireoide (ONYIKE; DIEHL-SCHMID, 2013).

Dentre as manifestações clínicas da DFT, um tipo específico, chamado de IBMPFD (do inglês – “*Inclusion body myopathy with Paget disease and frontotemporal dementia*”), inclui sintomatologia e diagnóstico compatível com DFT e doença de Paget de início precoce. A IBMPFD é uma doença



multissistêmica causada especificamente por mutações *missense* no gene que codifica a proteína VCP humana, resultando em fraqueza e atrofia muscular proximal e distal, comprometimento cardíaco, além de degeneração nos lobos frontais e temporais (MILLER, T D *et al.*, 2009).

### 1.1 Proteína contendo valosina (VCP)

A Proteína Contendo Valosina (VCP, do inglês – “*Valosin-containing Protein*”) é uma proteína hexâmerica de 806 aminoácidos (GUO *et al.*, 2019), pertencente à família das AAA-ATPases (Adenosina Trifosfatada) do tipo II (NIWA *et al.*, 2012; WATTS *et al.*, 2007; CHAPMAN; FRY; KANG, 2011; YAMANAKA; SASAGAWA; OGURA, 2012; BAYRAKTAR *et al.*, 2016). A VCP é altamente conservada entre as espécies (HALAWANI *et al.*, 2009). A VCP está envolvida em uma série de processos celulares essenciais, como: fusão de membrana, reconstrução do envelope nuclear e remontagem de Golgi pós-mitótica e degradação de proteína dependente de ubiquitina (WATTS *et al.*, 2007; GUO *et al.*, 2019). Além disso, a VCP possui funções relacionadas à ativação da transcrição, mitose, apoptose, via de reparo do DNA (Ácido Desoxirribonucleico), degradação associada ao Retículo Endoplasmático (RE) (MOREIRA, 2016; GUO *et al.*, 2019; S. SPINA *et al.*, 2013; BAYRAKTAR *et al.*, 2016), degradação de proteínas mediada por proteassoma, controle do ciclo celular, autofagia, e morte celular em alguns processos envolvendo a possibilidade de lise do ATP (KAKIZUKA, 2015).

A VCP pode ser subdividida nos seguintes domínios funcionais: I) N-Terminal: Regula as ligações primárias da proteína VCP e participa da ligação ao substrato e cofator enzimático (GUO *et al.*, 2019; HUANG *et al.*, 2020); II) D1: atividade de ATPase (CLOUTIER *et al.*, 2013), além de ser responsável pela regulação da formação de hexâmeros da VCP; III) D2: também possui atividade de ATPase (GUO *et al.*, 2019; HUANG *et al.*, 2020). A porção C-terminal da proteína VCP (HALAWANI *et al.*, 2009; MOUNTASSIF *et al.*, 2015; NIWA *et al.*, 2012) parece estar associada a processos catabólicos celulares como a autofagia (BAYRAKTAR *et al.*, 2016) e também para manter a estabilidade do hexâmero (CHIA *et al.*, 2012; NIWA *et al.*, 2012)

Assim como outras AAA-ATPases, a estrutura quaternária da VCP trata-se de um homohexâmero estruturado em forma de barril. Esse barril é composto anéis empilhados, formados pela ligação do domínio N-terminal da VCP, flexível, ao domínio D1 (GUO et al., 2019; HUANG et al., 2020; MOUNTASSIF et al., 2015). Durante o ciclo da atividade de ATPase, importantes mudanças conformacionais na VCP são observadas, sobretudo, no domínio N-terminal. Tais alterações, decorrentes da ligação/desligamento do substrato na região N-terminal, permitem com que a VCP atue como uma espécie de chaperona (HALAWANI et al., 2009), realizando a extração/remodelagem do substrato e a desmontagem do complexo macromolecular (BUCHBERGER; SCHINDELIN; HÄNZELMANN, 2015).

Para a realização de suas atividades biológicas, a VCP utiliza as proteínas adaptadoras que ligam ao seu domínio N-terminal (YE; MEYER; RAPOPORT, 2003), dentre elas: Ufd1 (do inglês – Ubiquitin fusion degradation-1), Npl4 (do inglês – Nuclear protein localization-4), p47-VCIP (VCP interacting protein), e VIMP (do inglês – VCP interacting membrane protein) (HALAWANI; LATTERICH, 2006).

A via ubiquitina funciona através da mitofagia (tipo especial de autofagia) que ocorre quando as mitocôndrias velhas ou danificadas são primeiro ubiquitinada por E3-ligases como PARK2 (Parkin) e, em seguida, degradadas pelo sistema de autofágico com a participação da VCP (BAYRAKTAR *et al.*, 2016; FANG *et al.*, 2015; LLEWELLYN *et al.*, 2020).

As proteínas ou organelas destinadas à degradação por autofagia, são capturadas em vesículas de dupla membranas chamadas de autofagossomos, que, por sua vez, se fundem aos lisossomos dando origem aos autolisossomos. Dentro do ambiente ácido dos autolisossomos, proteases e lipases, quebram essas proteínas e organelas em partes menores, os quais são transportados ao citosol e reutilizados pela maquinaria celular (BAYRAKTAR *et al.*, 2016). Dentre as proteínas envolvidas na formação e maturação de autofagossomos estão, a ATG8/MAP1LC3, que são processadas no sítio C-terminal da VCP, liberando a forma livre da proteína LC3-I. Em seguida, dois mecanismos semelhantes a ubiquitinação catalisam a conjugação de LC3-I a uma molécula lipídica chamada fosfatidiletanolamina e

formam a LC3-II associada a membrana autofágica (KABEYA *et al.*, 2000; TANIDA; UENO; KOMINAMI, 2020; BAYRAKTAR *et al.*, 2016). Com a associação a outras proteínas de ligação a ubiquitina, a VCP, consegue facilitar a degradação de proteínas via proteassoma e autofagia (GONZALEZ *et al.*, 2014).

## 1.2 Fisiopatologia da ELA/DFT-VCP

Os mecanismos da fisiopatologia que levam à degeneração em ELA e DFT ainda não são totalmente compreendidos. No entanto, os principais mecanismos já descritos associados ao desenvolvimento dessas doenças são: neuroinflamação (LYON *et al.*, 2018), disfunção de autofagia, processamento deficiente de RNA, desarranjos no citoesqueleto (ROBBERECHT; PHILIPS, 2013), toxicidade mediada por glutamato, tráfego e sinalização intracelular deficiente, estresse oxidativo, agregação proteica e disfunção mitocondrial (PALMA, 2016).

Dentre as principais causas associadas ao desenvolvimento de ELA e DFT, estão mutações na proteína VCP humana. Os principais mecanismos celulares afetados por essas mutações incluem a disfunção da degradação proteica e da homeostase de cálcio, mecanismos centrais envolvidos na fisiopatologia da ELA (MEJZINI *et al.*, 2019; SUN; QIU, 2020; TIRYAKI; HORAK, 2014; YAO *et al.*, 2020).

O Retículo Endoplasmático (RE) é caracterizado por ser uma rede membranosa de túbulos ramificados e sacos achatados, presente em células eucarióticas que se estende pelo citoplasma, sendo responsável pela biossíntese, enovelamento, montagem e modificação de inúmeras proteínas solúveis e síntese de proteínas de membrana (FRIEDMAN *et al.*, 2010; LOPEZ-CRISOSTO *et al.*, 2017; TERASAKI; CHEN; FUJIWARA, 1986). Além disso, essa organela pode ainda ser dividida em: I) Retículo Endoplasmático Liso (REL), responsável por criação e armazenamento de lipídios e esteroides; II) Retículo Endoplasmático Rugoso (RER), responsável pela síntese de proteínas (TERRENCE SANVICTORES & DONALD D. DAVIS, 2020).

O aumento da demanda por enovelamento/re-enovelamento de proteínas, ou estímulos que afetem o correto enovelamento dessas macromoléculas criam um desequilíbrio da proteostase, fazendo com que proteínas mal enoveladas se acumulem no lúmen gerando um processo de estresse do RE, que, em última instância, resulta em ativação de vias de morte celular (ZHANG, Kezhong; KAUFMAN, 2008).

A VCP está envolvida na conjugação dos substratos na cadeia de ubiquitina pela interação com uma variedade de adaptadores de ubiquitina e no transporte dos substratos para o proteassoma 26S, crucial para a degradação proteica (ZHOU et al., 2017). Alterações estruturais e de expressão da VCP ocasionadas por mutações, contribuem para o desenvolvimento de várias patologias, incluindo a ELA e DFT, por meio de efeitos diretos no ER, nas mitocôndrias e no sistema ubiquitina-proteassoma, interferindo na degradação de proteínas e na homeostase do cálcio (SUN; QIU, 2020).

A disfunção da degradação proteica, por sua vez, resulta no acúmulo de proteínas mal-enoveladas, que iniciam processos tóxicos de agregação, impactando sobretudo em neurônios motores. O acúmulo de proteínas é um fator importante na marca de diversas doenças neurodegenerativas, incluindo a ELA e DFT (YEHUDA et al., 2017). As proteínas mal-enoveladas possuem uma propriedade em comum, a exposição de regiões hidrofóbicas de baixa complexidade, que favorecem interações aberrantes com outros componentes celulares (WEIDS et al., 2016). Proteínas e outras biomoléculas são sequestradas e inativadas durante esse processo (RAMESH; PANDEY, 2017), que resulta em uma reação em cadeia levando à disfunção de mecanismos celulares essenciais (TANAKA; MATSUDA, 2014).

O mal-enovelamento e a agregação de proteínas em determinadas condições, resulta na formação de fibras amiloides, estruturas ricas em folhas- $\beta$  e presente em muitas doenças neurodegenerativas. Esse tipo de estrutura, pode se acumular em ambiente extracelular, levando ao desenvolvimento de amiloides, quanto acumular em ambiente intracelular, na forma de inclusões (CHITI; DOBSON, 2017; RELINI et al., 2009; SIRANGELO et al., 2016).

Outra importante função do Retículo Endoplasmático é manter a homeostase de cálcio, indispensável para diversos eventos celulares, inclusive a contração muscular (WILKINSON, 2019; SUN; QIU, 2020; LOPEZ-CRISOSTO *et al.*, 2017; WELIHINDA; TIRASOPHON; KAUFMAN, 1999). Para tal, é necessário que o RE interaja com outras organelas no meio, sobretudo as mitocôndrias que fornecem o ATP necessário para liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (SUN; QIU, 2020). A proteína VCP desempenha um papel importante na regulação da homeostase de cálcio devido à sua atividade de ATPase. Mutações na VCP levam à desregulação desse equilíbrio (SUN; QIU, 2020), resultando em alterações mitocondriais que levam a distúrbios metabólicos e energéticos (RYAN; ASHKAVAND; NORMAN, 2020), resultando no desenvolvimento de câncer, doenças neurodegenerativas, doenças cardíacas, obesidade e diabetes (BHATTI; BHATTI; REDDY, 2017; FILADI; THEUREY; PIZZO, 2017; PAILLUSSON *et al.*, 2016; SORRENTINO; MENZIES; AUWERX, 2018; THOUDAM *et al.*, 2016).

Nos estudos de YAMAMOTO *et al.* (2004), YAMAMOTO *et al.* (2005) e ZHOU *et al.* (2017), o nível de expressão de VCP mostrou ser regulado positivamente em algumas patologias, principalmente em resposta ao aumento da degradação de proteínas. Estudos mostraram que a inibição de VCP poderia ser uma abordagem terapêutica promissora para o tratamento do câncer (YAMAMOTO *et al.*, 2004, 2005; ZHOU *et al.*, 2017). Por outro lado, alguns estudos descobriram que a VCP participa do crescimento e da sobrevivência dos cardiomiócitos e desempenha um papel protetor contra a patogênese induzida por estresse em doenças cardíacas, atenuando o estresse mitocondrial e ER por meio da regulação da homeostase do cálcio (LIZANO *et al.*, 2017, 2013; ZHOU *et al.*, 2017; ZHOU; STOLL; QIU, 2017).

### 1.3 Mutações na proteína VCP

Mutações na proteína VCP foram associadas ao desenvolvimento de várias doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, ELA, DFT, doença de Paget (ISHIKAWA *et al.*, 2012), além de cardiopatias (GUO *et al.*, 2019). As formas familiares de DFT-VCP apresentam padrão de herança mendeliana autossômica dominante (KOPPERS *et al.*, 2012).

A herança mendeliana pode ser definida como um tipo de herança genética que segue os princípios desenvolvidos por Gregor Mendel. A herança mendeliana é determinada por genes localizados em cromossomos, que são transmitidos de ambos os pais para seus filhos. Mendel propôs dois princípios ou leis que regem a genética mendeliana: i) a primeira lei diz que os caracteres herdados são produzidos por fatores independentes (alelo) que são transmitidos de forma inalterada de uma geração para a subsequente. ii) já a segunda lei, diz que esses fatores (alelos) estão presentes em pares nos indivíduos, sendo necessariamente, um alelo herdado do pai e outro da mãe. Esses alelos podem ser dominantes ou recessivos. O alelo dominante recebe esse nome pois consegue sobrepor (dominar) os efeitos do alelo recessivo, que, por sua vez, tem a sua característica sobreposta (desaparecida) nessa geração. Além disso, na formação de gametas, os dois alelos são separados, segregados, de forma que cada célula gamética possui apenas um alelo. Nesse sentido, apenas um gameta de cada um dos pais será utilizado para geração de um novo indivíduo (NEVES, 2021).

Nas formas familiares de ELA-VCP, a maior parte das mutações também apresentam padrão de herança mendeliana autossômica dominante (DE SOUZA *et al.*, 2015). Nesse padrão de herança, dada característica é manifestada nos indivíduos pela presença de pelo menos um alelo dominante em cromossomos autossomos, isto é, que armazenam características comuns a todos os indivíduos da espécie. Em geral, doenças com esse padrão de herança se manifestam em todas as gerações de dada família, e aproximadamente metade dos indivíduos são afetados em cada geração independente do sexo. Um indivíduo afetado geralmente possui pelo menos um genitor afetado pela mesma doença (KLUG *et al.*, 2010).

As mutações da VCP foram encontradas da seguinte forma na população estudada em estudo de *genome wide association*, cujos resultados estão disponíveis no dbSNP database: I) R95G, R159G, L198W, N387H e D592N: 4 a cada 100 mil indivíduos cada um; II) R159H: 8 a cada 100 mil indivíduos; III) I126F: 12 a cada 100 mil indivíduos; IV) R191Q: 16 a cada 100 mil indivíduos (WHEELER *et al.*, 2000). As demais mutações foram encontradas pontualmente em pacientes de estudos de caso. Esses estudos envolveram pesquisa da árvore genealógica dos pacientes e correlação clínica.

**Tabela 1: Tabela de mutação e frequência alélica encontradas na população de mais de 250 mil indivíduos.**

Mutação no DNA	Substituição de aminoácido	Frequência Alélica/250 mil indivíduos
C > G	R95G	0,000004
G > A	G97E	estudo de caso
A > T	I126F	0,000012
C > T	R155C	estudo de caso
G > A	R155H	estudo de caso
G > T	R155L	estudo de caso
G > C	R155P	estudo de caso
C > A	R155S	estudo de caso
C > G	R159G	0,000004
G > A	R159H	0,000008
G > A	E185K	estudo de caso
G > A	R191Q	0,000016
T > G	L198W	0,000004
C > A	A232E	estudo de caso
A > C	N387H	0,000004
G > A	D592N	0,000004

Grande parte das mutações da VCP levaram a substituição de G:C para T:A. Esse tipo de mutação, que decorre da substituição de bases nitrogenadas pirimidínicas por purínicas ou vice-versa, é chamado de transversões, sendo considerado uma assinatura de dano oxidativo no DNA. Esse tipo de dano se torna mais frequente em condições celulares de estresse oxidativo, em que ocorre o desbalanço na quantidade de moléculas oxidantes em detrimento de moléculas anti-oxidantes (ITSARA *et al.*, 2014). Dentre os principais responsáveis por danos oxidativos no DNA estão as espécies reativas de

oxigênio, geradas normalmente ao longo da cadeia respiratória. O radical hidroxila é uma das formas mais reativas e danosas de espécies reativas de oxigênio. Quando a base nitrogenada guanina é exposta a grandes quantidades de radical hidroxila, o que acontece com maior frequência condições de estresse oxidativo, ocorre a incorporação de uma hidroxila no carbono 8' da guanina, gerando uma 8-hidroxi guanina. A 8-hidroxi guanina, por sua vez, se parecia erroneamente com uma timina (G-T), levando ao aparecimento de uma transverso (MARTINEZ *et al.*, 2009).

A mutação R95G possui padrão de herança autossômico dominante, e leva ao desenvolvimento de um distúrbio chamado de Proteinopatia Multissistêmica do Tipo 1. Esse distúrbio decorre da interrupção das alterações normais de conformação da VCP que regulam a ligação dessa proteína ao seu cofator enzimático pela porção N-Terminal (HUANG *et al.*, 2020; WATTS, Giles D J *et al.*, 2004).

A mutação G97E é potencialmente patogênica pelo aumento da atividade de ATPase da VCP (JERATH *et al.*, 2015). Presente em família de pacientes com vários graus de fraqueza muscular, miopatia e vacúolos orlados. Entretanto nenhum dos familiares tinha demência frontotemporal (JERATH *et al.*, 2015).

A mutação I126F ocorre na porção N-Terminal, que está envolvida na ligação com a ubiquitina. Essa mutação foi descoberta em um estudo de caso, mas também já foi observada em outros organismos, como peixe-zebra, camundongo e frango (MATSUBARA *et al.*, 2016).

A mutação R155C foi associada à demência frontotemporal (BAYRAKTAR *et al.*, 2016) e é mais frequente em pacientes de etnia japonesa (IKEDA *et al.*, 2020). Na posição 155 da VCP ocorrem diversas mutações *missense* que causam demência frontotemporal (IKEDA *et al.*, 2020; BAYRAKTAR *et al.*, 2016; SURAMPALLI ET AL., 2017). A posição 155 está situada na porção N-terminal proteína VCP (CLEMEN *et al.*, 2018). Essa mutação impacta o processo de maturação das vesículas de autofagia e fusão lisossomal (BAYRAKTAR *et al.*, 2016). Essa mutação (SCHÜTZ; RENNELLA;



KAY, 2017) foi descrita por aumentar a atividade de ATPase da VCP em até 4 vezes quando comparada ao tipo selvagem (RIJAL *et al.*, 2016).

Pacientes heterozigóticos para a mutação R155H da VCP, apresentaram fraqueza muscular, acúmulo de inclusões positivos para LAMP-1, LAMP-2 e TDP43 (CHENG *et al.*, 2020; WEN *et al.*, 2010). Pacientes com a mutação R155C também apresentaram aumento da atividade de ATPase da VCP cerca de 4 vezes a mais quando comparada com a proteína selvagem. Essa mutação também resultou na redução da hexamerização da VCP (RIJAL *et al.*, 2016).

A mutação R155L está associada à doença de Paget e demência frontotemporal. A mutação possui padrão de herança autossômica recessiva. Os resultados mostraram que essa mutação também pode levar à disfunção do trato piramidal (KUMAR *et al.*, 2010).

A mutação R155P é mais prevalente em pacientes com demência frontotemporal ou doença de Paget. Esses pacientes apresentaram acúmulo de inclusões proteicas no citoplasma e núcleo, resultando em degeneração e distrofia neuronal (HALAWANI *et al.*, 2009). Além disso, a mutação R155P impacta negativamente a capacidade de ligação da VCP aos seus cofatores enzimáticos (MOUNTASSIF *et al.*, 2015).

A mutação R155S, por sua vez, ocasiona Miopatia – doença degenerativa que afeta os músculos do corpo, faríngeos e oculares (BENATAR *et al.*, 2013). Os achados iniciais relacionados à essa mutação incluem mudanças de comportamento ou linguagem. Alguns pacientes também desenvolvem anormalidades ósseas e desorganização esquelética polioestótica, além de apresentar fosfatase alcalina alterada (S. SPINA ET AL, 2013), elevação nos níveis de Creatina Quinase (CK) (GUO *et al.*, 2019; BODY *et al.*, 2014)

A variante R159G foi associada a patologias como a Doença de Paget, Miopatia e a demência frontotemporal, afetando sobretudo o neurônio motor inferior (BENATAR *et al.*, 2013). Já a mutação R159H, está associada com a doença de Alzheimer e demência frontotemporal (RAMOS-CAMPOY *et al.*, 2020).

A mutação E185K ocorre entre o domínio N-terminal e o domínio D1, resultando no aumento nos níveis da proteína LC3II paralelamente com a interrupção na maturação de autofagossomos (GONZALEZ *et al.*, 2014).

A mutação R191Q já foi associada à demência frontotemporal de início precoce e ELA familiar, sendo caracterizada pela presença de inclusões de ubiquitina TDP-43 positivas sobretudo em neurônios motores superiores (WATTS, Giles D J *et al.*, 2004; WATTS, G. D.G. *et al.*, 2007; JOHNSON *et al.*, 2010). Esta variante também a elevação dos níveis de fosfatase alcalina e achados ósseos típicos da doença de Paget (S. SPINA ET AL, 2013). Essa mutação também parece afetar a maturação nas membranas de vesículas autofágicas (BAYRAKTAR *et al.*, 2016).

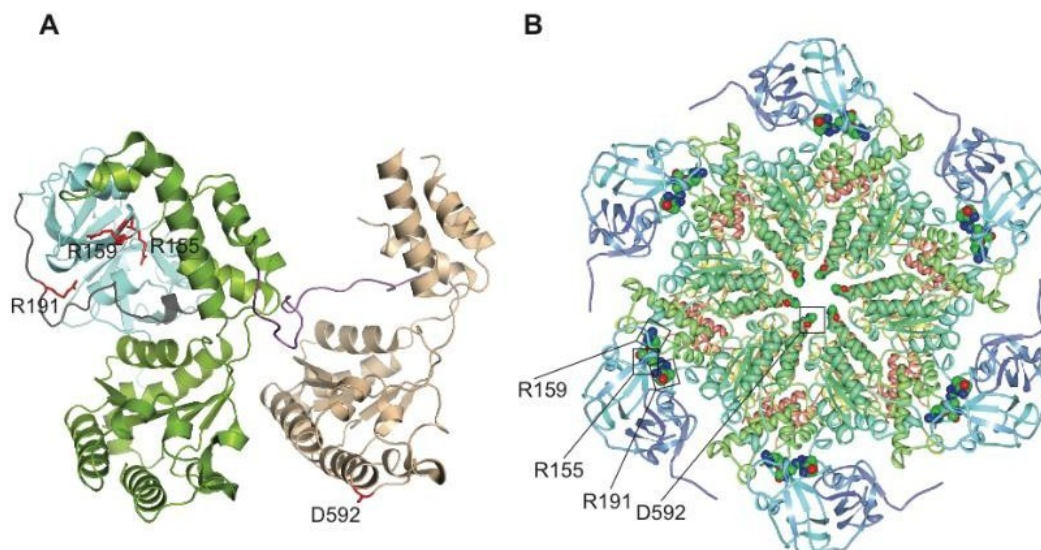
A variante L198W, por sua vez, também está associada à doença de Paget, levando à fraqueza muscular e impactando a capacidade de deambulação dos pacientes. Os achados histológicos mostraram tamanho variável da fibra muscular, vacúolos circulares e inclusões citoplasmáticas de proteínas (WATTS, G. D.G. *et al.*, 2007). Ainda assim, a substituição de triptofano por leucina na posição 198 pode alterar o movimento normal da porção N-terminal da VCP (WATTS, G. D.G. *et al.*, 2007).

A variante A232E está associada ao desenvolvimento de doença de Paget e demência frontotemporal grave (BENATAR *et al.*, 2013; HALAWANI *et al.*, 2009; KIMONIS *et al.*, 2008; RABOUILLE *et al.*, 1995; WATTS, Giles D J *et al.*, 2004). A mutação também já foi descrita por elevar até três vezes a atividade da ATPase. Esse aumento da atividade de ATPase da VCP parece ser mediado por alterações de flexibilidade no domínio D2 da proteína. O domínio D2 interage com a porção N-terminal da proteína, ativando/desligando a atividade da enzima (NIWA *et al.*, 2012).

Pacientes com as mutações N387H e L198W apresentaram sinais de fraqueza muscular, e presença de inclusões citoplasmáticas em neurônios motores. Essas mutações também foram associadas às doenças de Paget, Miopatia e demência frontotemporal (BENATAR *et al.*, 2013; WATTS, G. D.G. *et al.*, 2007). A mutação N387H ocorre na alfa-hélice 5 do domínio D1, mas fora do sítio catalítico deste domínio (WATTS, G. D.G. *et al.*, 2007).

A mutação D592N afeta uma posição diretamente localizada no poro central do hexâmero da VCP (Figura 1) (JOHNSON *et al.*, 2011). Essa variante foi encontrada em paciente com ELA familiar de início bulbar, sem comprometimento cognitivo. O paciente veio a óbito um ano após o diagnóstico (JOHNSON *et al.*, 2010).

**Figura 1. Estrutura tridimensional da proteína VCP humana**



(A) Estrutura tridimensional (fragmento) do monômero da VCP mostrando a localização dos resíduos mutados R155, R159, R191 e D592. (B) Estrutura tridimensional (fragmento) da VCP hexamérica vista de cima. Os resíduos R155, R159 e R191 estão localizados na fenda formada entre os domínios D1 e N-terminal da proteína. O resíduo D592 está diretamente adjacente ao poro central formado pelo hexâmero. Adaptado de Johnson et al. (2011).

#### 1.4 Tratamentos para a ELA e DFT

Apesar de um grande número de fármacos tenha sido proposto para o tratamento de ELA, apenas o Riluzol (em 1995) e o Edaravone (mais de 22 anos depois, em 2017) foram aprovados pelo departamento de Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA) para o tratamento de ELA (ROTHSTEIN, 2017; MEJZINI *et al.*, 2019).

O Edaravone é capaz de retardar a disfunção motora associada à ELA em estágios iniciais da doença. O ensaio clínico randomizado ocorrido no

Japão envolvendo 134 pacientes com menos de 2 anos do desenvolvimento de ELA, sugeriu que os índices de ALSFRS-R – escala de classificação funcional para a ELA – teve média reduzida de 7,50 nos grupos que receberam placebo (n=66), para 5,01 no grupo de pacientes que receberam edaravone (n=68). A diferença entre esses dois grupos foi estatisticamente significativa, confirmando a eficácia do fármaco (SAWADA, 2017). O edaravone age como um antioxidante, eliminando radicais livres, incluindo o peróxido lipídico e radicais de hidroxila. O fármaco atua minimizando a lesão oxidativa em neurônios do SNC (MASRORI; VAN DAMME, 2020; MEJZINI *et al.*, 2019; ROTHSTEIN, 2017).

O Riluzol, por sua vez, é capaz de apenas prolongar a vida do paciente por poucos meses. O estudo de FÁVERO *et al.*, 2017 comparou a curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de 231 pacientes no Brasil com diagnóstico confirmado para ELA durante 120 meses. Dentre esses 231 pacientes, 144 morreram antes de 19 meses do diagnóstico, e 87 morreram após esse período de tempo. A mediana de sobrevivência dos pacientes tratados com Riluzol do grupo de pacientes que morreram com menos de 19 meses não foi significativa estatisticamente. Entretanto, para os pacientes que sobreviveram por mais de 19 meses, a mediana de sobrevivência do grupo de pacientes tratados com Riluzol foi de 36,6 meses, ao passo que a do grupo não tratado com o fármaco foi de 27,4, apresentando diferença estatística (teste *log-rank*,  $p = 0.001$ ) (FÁVERO *et al.*, 2017). Além disso, uma série de ensaios clínicos randomizados realizados em populações europeias e norte americanas que compararam as curvas e mediana de sobrevivência entre pacientes tratados com Riluzol e placebo apontaram para uma tendência de aumento da sobrevivência global em cerca dois a três meses (MILLER *et al.*, 2012). O Riluzol é um antagonista de glutamato, atuando nos neurônios motores, reduzindo a excitotoxicidade mediada por glutamato. Seu mecanismo de ação tem efeitos nos receptores de glutamato, como demonstrado em (MEJZINI *et al.*, 2019) estudos *in vitro* inibe a liberação de glutamato, desta forma, protegendo as células de danos mediados pelo excesso de estimulação por glutamato (STUDIES, 1997).

Já para a demência frontotemporal, ainda não existem terapias modificadoras de doença disponíveis ou aprovadas. O manejo da doença é limitado a tratamentos dos sintomas por meio do uso de recaptadores seletivos de serotonina e antipsicóticos (KIRSHNER, 2014; WAUTERS *et al.*, 2017).

### **1.5 Análise *in silico***

Com o avanço das técnicas de biologia molecular no sequenciamento de genomas, tem sido produzido um grande volume de dados biológicos, implicando na necessidade da bioinformática e métodos *in silico* para organizar e analisar de forma mais completa esses dados. O grande número de sequências de proteínas determinadas não foi acompanhado pelo número restrito de novas estruturas proteicas depositadas em bancos de dados, de forma que se estabeleceu um desbalanço entre a quantidade de estruturas e sequências. A partir do conhecimento da sequência da proteína, é possível prever sua estrutura tridimensional utilizando a bioinformática com relativa acurácia, que muitas vezes se equipara à de métodos experimentais de determinação estrutural. Além disso, a quantidade de novas mutações descobertas no genoma está muito além da capacidade atual de caracterização experimental de seus efeitos, que ainda é muito cara, demorada e de difícil execução (PEREIRA, G. R.C. *et al.*, 2019). Nesse cenário, novamente, os métodos *in silico* se apresentam como uma abordagem necessária, pois viabilizam a caracterização estrutural e funcional de mutações a baixo custo/efetividade e acurácia elevada (CALABRESE *et al.*, 2009). O efeito dessas variantes genéticas pode ser predito a partir de modelagens de bioinformática estrutural projetadas para quantificar enovelamentos incorretos da proteína, agregação, e interação com outras proteínas.

Além disso, as novas mutações descobertas na população podem ainda influenciar na efetividade de medicamentos, dosagens e efeitos adversos. Essas variantes podem afetar a estrutura da proteína em sítios cruciais para a ligação com o fármaco, impactando nos modos de ligação e afinidade proteína-ligante. De forma que essa informação genética é de grande importância para o

desenvolvimento de novos fármacos em geral é crucial para a medicina de precisão (CARRASCO-RAMIRO; PEIRÓ-PASTOR; AGUADO, 2017).

O uso de simulações computacionais, *in silico*, torna ainda possível a compreensão e caracterização de regiões proteicas potencialmente envolvidas no desenvolvimento de patologias, auxiliando a melhor compreensão das bases estruturais da doença. As metodologias *in silico* podem, portanto, guiar o desenho racional de fármacos, baseado na estrutura de seus alvos, e facilitar o desenvolvimento de tratamentos e diagnósticos de diversas enfermidades. A pesquisa nesta área é inovadora e estratégica para fornecer o suporte necessário às áreas experimentais e impulsionar significativamente as descobertas científicas (VERLI, 2014).

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivos gerais**

Caracterizar por meio de simulação computacional, *in silico*, possíveis alterações estruturais e funcionais causadas pelas 16 mutações descritas na literatura para proteína VCP humana.

### **2.2 Objetivos específicos**

- I. Obter a sequência, estrutura e variantes da proteína VCP Humana em bancos de dados;
- II. Realizar predição funcional e de características estruturais das variantes;
- III. Analisar a conservação evolutiva da proteína;
- IV. Modelar e validar a estrutura tridimensional da proteína VCP nativa;
- V. Realizar a modelagem estrutural das variantes da VCP;
- VI. Realizar alinhamento estrutural entre as estruturas nativas e mutantes da VCP.

### **3. METODOLOGIA**

Seguindo a metodologia estabelecida pelo Grupo de Bioinformática e Biologia Computacional da UNIRIO (DE CARVALHO; DE MESQUITA, 2013; KREBS; DE MESQUITA, 2016; MOREIRA *et al.*, 2013; PEREIRA, G. R.C. *et al.*, 2019), foram realizadas as seguintes etapas:

#### **3.1 Obtenção da sequência, estrutura e compilação das variantes**

A sequência da proteína foi obtida no UniProt (ID: P55072). A estrutura tridimensional da VCP nativa foi obtida a partir do banco de dados Protein Data Bank (PDB). Dentre as estruturas experimentais disponíveis para a VCP no PDB, foi escolhida a estrutura de maior cobertura de sequência e maior resolução (PDB ID: 5FTK). As variantes genéticas da proteína VCP humanas foram compiladas dos bancos de dados: Uniprot (BATEMAN, 2019), OMIM (ID: 601023) (HALLIDAY *et al.*, 2010) e revisão de literatura no PubMed. Dado que as formas familiares de ELA e a DFT possuem padrão de herança genética mendeliana (DE SOUZA *et al.*, 2015; KOPPERS *et al.*, 2012), o banco de dados OMIM foi utilizado para a obtenção das mutações *missense* da proteína VCP (WHEELER *et al.*, 2000). A plataforma OMIM é um banco de dados de genética médica, o qual fornece informações textuais concisas baseadas na literatura biomédica revisada por pares sobre mais de 15.500 genes, 26.200 variantes alélicas e 7.800 fenótipos genéticos que possuem padrão de herança mendeliana (AMBERGER; HAMOSH, 2018).

#### **3.2 Análise de predição do efeito das mutações**

Seguindo a metodologia já estabelecida por nosso grupo (DA SILVA *et al.*, 2019; DE OLIVEIRA *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2018; ROSA *et al.*, 2018) as variantes genéticas compiladas da proteína VCP tiveram seus efeitos funcionais e estruturais preditos utilizando 12 algoritmos. Esses algoritmos utilizam informações evolutivas e/ou físico-químicas obtidas a partir da sequência da proteína e da substituição de aminoácidos correspondente para predizer se: 1) a mutação é neutra ou deletéria (predição funcional); 2) a mutação aumenta, diminui ou não afeta a estabilidade da proteína (predição de estabilidade); 3) a mutação aumenta, diminui ou não afeta a agregação

proteica, propensão amilóide e tendência de ligação à chaperonas (fenotipagem estrutural da mutação).

Para a análise do efeito das mutações, a sequência no formato fasta da proteína nativa e as mutações compiladas foram submetidas aos algoritmos de predição. Os seguintes algoritmos foram utilizados para a predição funcional das variantes: I) PhD-SNP (CAPRIOTTI; FARISELLI, 2017), Provean (CHOI; CHAN, 2015), SIFT (VASER *et al.*, 2015), PolyPhen-2 (ADZHUBEI *et al.*, 2010), PredictSNP (BENDL *et al.*, 2014), Pon-p2, SNPs&GO (CALABRESE *et al.*, 2009), SNAP2 (SOLAYMAN *et al.*, 2017), PMUT (CONDE *et al.*, 2005) e MutPred2 (PEJAVER *et al.*, 2017). Os algoritmos I-Mutant2.0 (CAPRIOTTI; FARISELLI; CASADIO, 2005) e Fold-X (incluído no servidor SNPEffect4.0), foram utilizados para a predição de estabilidade. Por fim, os algoritmos WATLZ, TANGO e LIMBO do servidor SNPEffect4.0 – servidor voltado à fenotipagem estrutural de mutações missense – foram utilizados para a predição da propensão amiloide, agregação proteica e tendência de ligação à chaperonas, respectivamente (DE BAETS *et al.*, 2012).

Os algoritmos de predição funcional e de estabilidade utilizam conceitos aprendizado de máquinas e estatística para identificar padrões em grandes conjuntos de dados (treino), a partir dos quais criam modelos matemáticos capazes de fazer inferências sobre novos casos, fora do conjunto treino, com relativa precisão. Esses algoritmos extraem informações a partir da sequência da proteína submetida, ou de estruturas tridimensionais, quando disponíveis, e então classificam o comportamento de dada mutação (LEE; MONARD, 2003; TAVARES; LOPES; LIMA, 2007). Dentre os principais parâmetros levados em consideração por esses algoritmos, estão: i) conservação evolutiva; ii) alterações de energia livre; iii) propriedade físico-química do aminoácido substituído; iv) acessibilidade ao solvente; v) estrutura secundária; vi) flexibilidade; vii) importância/informações sobre a região afetada (anotações funcionais); viii) informações de interatoma; ix) modificações pós-translacionais; x) localização celular (ADZHUBEI; JORDAN; SUNYAEV, 2013; BROMBERG; YACHDAV; ROST, 2008; CAPRIOTTI, E.; CALABRESE; CASADIO, 2006; CAPRIOTTI, Emidio *et al.*, 2013; DE BAETS *et al.*, 2012; KUMAR; HENIKOFF; NG, 2009).



### 3.3 Modelagem estrutural e validação da proteína VCP nativa

Por meio de simulação computacional, é possível prever a estrutura tridimensional de proteínas com acurácia/qualidade muitas vezes equiparada ou até superior à de métodos experimentais de determinação estrutural, como a difração de raios-X (PEREIRA, G. R.C. *et al.*, 2019). A estrutura completa da proteína VCP humana foi gerada utilizando modelagem comparativa, *ab initio* e *threading* nos algoritmos I-Tasser (*threading*) (YANG; ZHANG, 2015), MholLine (modelagem comparativa) (CAPRILES *et al.*, 2010) e SwissModel (*threading*) (KIEFER *et al.*, 2009). Além disso, dois métodos diferentes de modelagem foram utilizados no servidor Robetta: I) modelagem *ab initio* e comparativa; II) modelagem por *threading* (KIM; CHIVIAN; BAKER, 2004).

A modelagem comparativa é a abordagem mais precisa dentre os métodos computacionais de predição de estruturas de proteínas, podendo gerar modelos com acurácia semelhante à de estruturas experimentais (KHAN *et al.*, 2016). Entretanto, a modelagem comparativa depende de estruturas tridimensionais homólogas como molde, ficando por vezes inviabilizada (NIEDZIALKOWSKA *et al.*, 2016). Já a modelagem *ab initio* é um método necessário para prever estruturas de proteínas quando a modelagem comparativa ou por *threading* não puder ser realizada, pois não depende de estruturas molde, utilizando somente informações obtidas a partir da sequência e conceitos de termodinâmica. Esse método, por sua vez, possui a menor acurácia dentre os métodos *in silico* de modelagem estrutural, e ainda é limitado a predições de pequenas regiões/proteínas (KIHARA; CHEN; YANG, 2009; PEREIRA *et al.*, 2019). Já a modelagem por *threading*, é uma abordagem que apresenta acurácia intermediária entre os dois métodos citados anteriormente. Esse método utiliza uma combinação de pequenos fragmentos de estruturas determinadas experimentalmente (biblioteca de fragmentos) como molde, sendo, portanto, menos dependente de estruturas experimentais que a modelagem comparativa. A modelagem por *threading* também pode ser aplicada a faixas de menor identidade de sequência, em relação à modelagem comparativa que, por sua vez, necessita de estruturas experimentais de maior identidade para a predição (VERLI, 2014).

Para modelagem comparativa da proteína VCP nativa nos algoritmos MholLine e SwissModel, foram utilizadas como molde as coordenadas atômicas das estruturas tridimensionais 6G2Z e 5FTK, respectivamente, determinadas experimentalmente e disponível no banco de dados *Protein Data Bank* (ROSE *et al.*, 2016). O MholLine combina um conjunto específico de programas, que inicialmente realizam alinhamentos de múltiplas sequências, predição de regiões transmembrana e anotações funcionais para a detecção de estrutura homólogas, a qual é, então, utilizada como *template* para a modelagem no *software* Modeller. Por fim a qualidade da estrutura é verificada quanto a aspectos estereoquímicos pelo *software* PROCHECK (CAPRILES *et al.*, 2010). O SwissModel é um servidor de modelagem automatizado que realiza alinhamento de múltiplas sequências e um algoritmo de busca probabilística (aprendizado de máquinas) para detectar sequências potencialmente relacionadas de estrutura conhecida dentro de uma biblioteca própria de estruturas (BIASINI *et al.*, 2014).

Para o método de modelagem comparativa e *ab initio* no servidor Robetta divide a proteína em domínios. A região da proteína que possui coordenadas atômicas conhecidas (determinadas experimentalmente) foram preditas por modelagem comparativa utilizando como molde estruturas do PDB (nesse caso, a estrutura 7JY5). As regiões proteicas ainda não determinadas experimentalmente, por sua vez, foram preditas utilizando modelagem *ab initio*, método que utiliza princípios termodinâmicos a partir de informações contidas na sequência da proteína. Os fragmentos gerados *ab initio* foram, então, unidos aos domínios modelados comparativamente, e a estrutura resultante submetida a simulações de Monte Carlo para simular o processo de enovelamento proteico e, assim, otimizar propriedades físico-químicas da estrutura (KIHARA; CHEN; YANG, 2009; KIM; CHIVIAN; BAKER, 2004).

Já a modelagem por *threading* no servidor Robetta e I-Tasser utilizou como molde coordenadas de pequenos fragmentos de proteínas experimentais contidas em bibliotecas (banco de dados) próprias (KIM; CHIVIAN; BAKER, 2004; YANG; ZHANG, 2015). O I-TASSER modela a estrutura tridimensional de proteínas por meio da união e organização de fragmentos experimentais. Esses fragmentos são montados de acordo com resultados de alinhamento de

múltiplas sequências e anotações funcionais. O modelo final com os fragmentos unidos passa por simulações de Monte Carlo a fim de calcular o enovelamento proteico (amostrar). As conformações de menor energia livre são então identificadas e refinadas geometricamente (YANG; ZHANG, 2015). Já a abordagem do Robetta *threading* é baseada em *deep learning*, o TrRosetta, que realiza alinhamento de múltiplas sequências e um algoritmo de busca para detectar pequenos fragmentos potencialmente relacionados a sequência submetida. O algoritmo então combina e une esses fragmentos levando em consideração as distâncias e orientações dos átomos, bem como restrições estéricas. Os fragmentos resultantes tem sua energia minimizada e relaxada, dando origem aos modelos finais (YANG *et al.*, 2020).

Os modelos tridimensionais gerados *in silico* foram inicialmente analisados quanto ao tamanho da estrutura modelada e a completude de seu enovelamento. Modelos incompletos em tamanho e enovelamento foram desconsiderados para a validação estrutural.

Apenas os modelos completos foram submetidos à etapa de alinhamento estrutural realizada no servidor TM-Align, que se baseia na sobreposição entre duas estruturas proteicas. Nesse estudo, o modelo criado computacionalmente foi sobreposto a uma estrutura molde determinada experimentalmente (PDB ID: 5FTK) a fim de verificar a similaridade estrutural, etapa essencial para validação de modelos teóricos. O alinhamento estrutural no TM-Align retorna valores de RMSD e TM-score, parâmetros de similaridade estrutural. Apenas modelos similares à estrutura experimental 5FTK – isto é: modelos que apresentaram valores de RMSD menores que 2Å e TM-score maior que 0.5 – foram selecionados para a etapa subsequente de análise da qualidade estrutural (ZHANG, Yang; SKOLNICK, 2005).

A análise da qualidade estrutural dos modelos criados foi realizada utilizando seis algoritmos. O ERRAT, Verify3-D e PROCHECK foram utilizados dentro do servidor SAVES (KREBS; DE MESQUITA, 2016). O PROCHECK analisa a qualidade estereoquímica da proteína baseado na disposição dos ângulos *Phi* e *Psi* de torção da cadeia principal de cada aminoácido da proteína no gráfico de Ramachandran (LASKOWSKI *et al.*, 1993). O Verify-3D atribui um valor de qualidade geral para o modelo baseado na compatibilidade entre a

estrutura e sequência da proteína (EISENBERG, David; LÜTHY; BOWIE, 1997). O ERRAT atribui um valor de qualidade geral para o modelo baseado na probabilidade de erro que cada aminoácido da proteína possui. Já o ProSa (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007) e o QMEAN (BENKERT; KÜNZLI; SCHWEDE, 2009) comparam a qualidade do modelo em questão com a qualidade de estruturas experimentais de proteínas depositadas no banco de dados PDB. Por fim, o MolProbity realiza análises geométricas e de contatos entre todos os átomos e, então, atribui um valor de qualidade geral para o modelo tridimensional.

Os modelos teóricos que ficaram reprovados na análise de qualidade em qualquer um dos seis algoritmos de validação foram desconsiderados. Dentre os modelos teóricos aprovados (validados) por todos os algoritmos, foi selecionado para as etapas subsequentes deste estudo aquele que apresentou os maiores indicadores de qualidade.

### **3.4 Análise de conservação evolutiva**

O modelo validado da VCP humana foi submetido à análise de conservação evolutiva no algoritmo ConSurf, que analisa o grau de conservação de cada aminoácido da proteína por meio de alinhamento de múltiplas sequências e construção de árvore filogenética. Os seguintes parâmetros foram selecionados para a análise do ConSurf: identificador de cadeia: A; algoritmo de busca homóloga: PSI-BLAST; número de iterações: 3; ponto de corte para o E-value: 0.0001; banco de dados de proteínas: UniProt; sequência de referência: mais próxima (do inglês – “closest”); número de sequências de referência selecionadas: 150; valor máximo de identidade de sequência: 95%; valor mínimo de identidade de sequência: 35%; método de alinhamento: MAFFT-L-INS-i; método de cálculo: Bayesiano; modelo de substituição evolutiva: melhor modelo (ASHKENAZY *et al.*, 2016).

### **3.5 Modelagem estrutural das variantes**

As sequências de todas as 16 variantes da VCP (R95G, G97E, I126F, R155C, R155H, R155L, R155P, R155S, R159G, R159H, E185K, R191Q,

L198W, A232E, N387H e D592N) foram construídas por meio da indução da substituição de aminoácido correspondente na sequência fasta da proteína nativa utilizando o bloco de notas. As coordenadas do modelo validado da proteína VCP nativa foram utilizadas como molde para a modelagem comparativa das variantes. A modelagem comparativa das variantes foi realizada utilizando o algoritmo RosettaCM, a partir da submissão das sequências mutantes e modelo validado da VCP (SONG *et al.*, 2013).

Os modelos das variantes foram então alinhados experimentalmente com o modelo validado da VCP nativa utilizando o algoritmo TM-Align (ZHANG, Yang; SKOLNICK, 2005). Os valores de RMSD e TM-score do alinhamento foram então analisados juntamente com uma inspeção visual das estruturas tridimensionais alinhadas, de forma a verificar possíveis alterações estruturais nas variantes em relação à proteína selvagem.

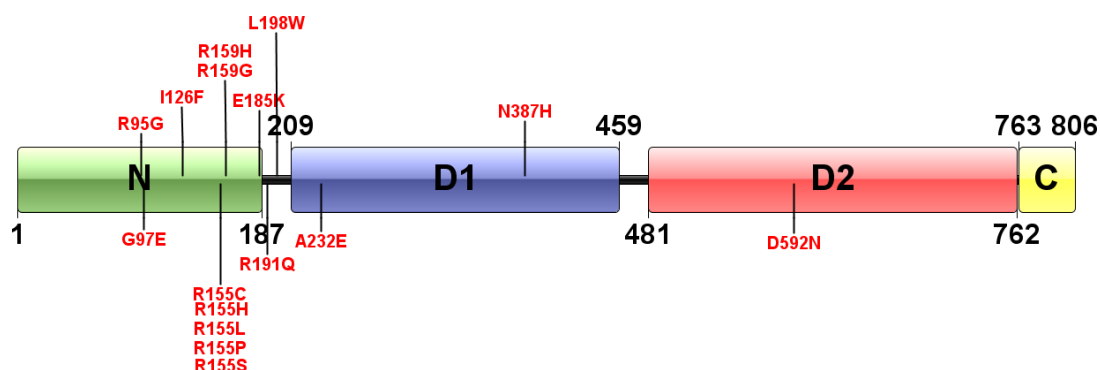
## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Obtenção da sequência, estrutura e compilação das variantes**

A sequência da proteína nativa da VCP humana obtida no UniProt (ID: P55072) é completa, e possui 806 aminoácidos de extensão. Todas as estruturas experimentais da VCP humana contida no banco de dados PDB são incompletas (fragmentos). Dentre os fragmentos estruturais disponíveis, o fragmento 5FTK, determinado por eletrocromicroscopia, apresenta a maior cobertura de sequência (aminoácidos 21-706 & 728-761) e maior resolução (2.40 Å), e foi, portanto, selecionado para etapas subsequentes deste estudo (ROSE *et al.*, 2017).

Foram compiladas, ao todo, 16 variantes da VCP humana, representadas esquematicamente na Figura 2 junto aos domínios conhecidos da proteína (BRAUN, 2014). Como mostrado na Figura 2, a maior parte das mutações (68%) ocorre no domínio N-terminal, duas mutações no domínio D1 e apenas uma mutação no domínio D2. As mutações R191Q e L198W não ocorreram em domínios conhecidos da VCP.

Figura 2. Representação esquemática da proteína VCP humana.



As variantes compiladas estão destacadas em vermelho junto ao seu local de ocorrência na proteína, que está representado por uma linha preta. Os domínios N-terminal, D1, D2 e C-terminal estão coloridos de verde, azul, vermelho e amarelo, respectivamente. Os sítios (posição) de início e término de cada domínio também são mostrados na proteína. Adaptado de BRAUN, 2014.

A Tabela 2 mostra o aminoácido que foi substituído em cada mutação, levando em consideração suas características físico químicas. A mutação N387H, representada em verde, foi a única que não acarretou em alteração das propriedades físico químicas de aminoácido, enquanto todas as demais mutações, representadas em vermelho, levam à alterações de propriedades físico químicas.

Tabela 2: Propriedades físico-químicas das substituições de aminoácidos decorrentes das mutações da proteína VCP humana.

Posição	Variante	Aminoácido original	Aminoácido mutado
95	R95G	Arginina (R): aminoácido grande e básico	Glicina (G)
97	G97E	Glicina (G)	Glutamato (E): aminoácido médio e ácido
126	I126F	Isoleucina (I): aminoácido médio e hidrofóbico	Fenilalanina (F): aminoácido grande e aromático
155	R155C	Arginina (R): aminoácido grande e básico	Cisteína (C): aminoácido médio e polar
155	R155H	Arginina (R): aminoácido grande e básico	Histidina (H): aminoácido médio e polar
155	R155L	Arginina (R): aminoácido grande e básico	Leucina (L): aminoácido médio e hidrofóbico
155	R155P	Arginina (R): aminoácido grande e básico	Prolina (P): aminoácido médio e hidrofóbico
155	R155S	Arginina (R): aminoácido grande e básico	Serina (S): aminoácido pequeno e polar
159	R159G	Arginina (R): aminoácido grande e básico	Glicina (G)
159	R159H	Arginina (R): aminoácido grande e básico	Histidina (H): aminoácido médio e polar
185	E185K	Glutamato (E): aminoácido médio e ácido	Lisina (K): aminoácido grande e básico
191	R191Q	Arginina (R): aminoácido grande e básico	Glutamina (Q): aminoácido médio e polar
198	L198W	Leucina (L): aminoácido médio e hidrofóbico	Triptofano (W): aminoácido grande e aromático
232	A232E	Alanina (A): aminoácido pequeno e hidrofóbico	Glutamato (E): aminoácido médio e ácido
387	N387H	Asparagina (N): aminoácido médio e polar	Histidina (H): aminoácido médio e polar
592	D592N	Aspartato (D): aminoácido médio e ácido	Asparagina (N): aminoácido médio e polar

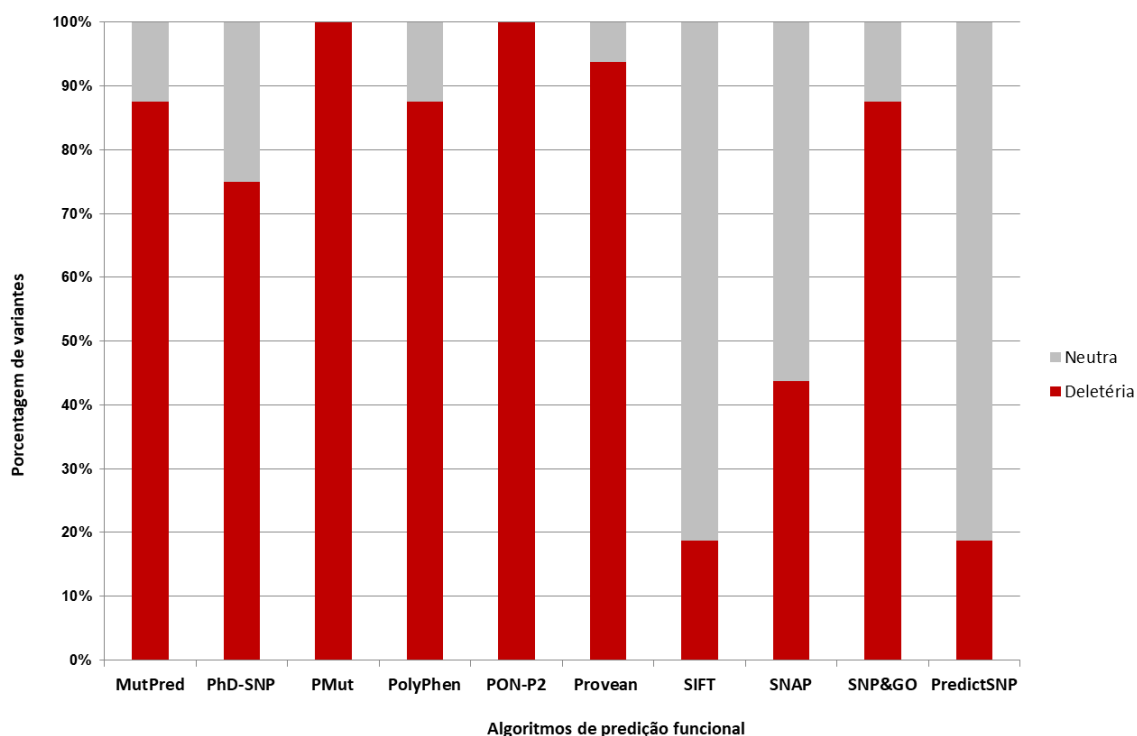
Embora a mutação N387H acarrete em uma substituição de um resíduo de aminoácido asparagina (N) para histidina (H) na posição 387, trocando um resíduo médio e polar para outro de mesma característica físico-química, o estudo de caso de WATTS *et al.* (2007) mostrou que essa mutação está relacionada ao desenvolvimento das seguintes patologias: doença de Paget, Miopatia e demência frontotemporal (BENATAR *et al.*, 2013; WATTS, G. D.G. *et al.*, 2007). Além disso, essa mutação localizada na alfa-hélice 5 do primeiro domínio D1, responsável pela atividade de ATPase (CLOUTIER *et al.*, 2013), além da regulação da formação de hexâmeros da VCP e ligação da enzima aos seus co-fatores enzimáticos (GUO *et al.*, 2019; Apud HUANG *et al.*, 2020). Entretanto, a região afetada pela mutação N387H fica localizada fora do sítio catalítico contido no domínio D1.

#### **4.2 Análise de predição do efeito das mutações**

Os resultados de predição funcional das variantes da VCP por algoritmo estão mostrados na Figura 3. De acordo com a revisão de literatura realizada, todas as mutações compiladas já foram associadas ao desenvolvimento de pelo menos uma patologia (IKEDA *et al.*, 2020; BAYRAKTAR *et al.*, 2016; SURAMPALLI ET AL., 2017; SCHÜTZ; RENNELLA; KAY, 2017; RIJAL *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2010; HALAWANI *et al.*, 2009; RAMOS-CAMPOY *et al.*, 2020; GONZALEZ *et al.*, 2014; WATTS, Giles D J *et al.*, 2004; WATTS, G. D.G. *et al.*, 2007; JOHNSON *et al.*, 2010; S. SPINA ET AL, 2013; BENATAR *et al.*, 2013; HALAWANI *et al.*, 2009; KIMONIS *et al.*, 2008; RABOUILLE *et al.*, 1995; HUANG *et al.*, 2020; JERATH *et al.*, 2015; MATSUBARA *et al.*, 2016).

Os algoritmos PMut e PON-P2 foram os algoritmos com a maior taxa de predição deletéria (100%) e, portanto, os algoritmos com maior taxa de acerto de predição. Por outro lado, o algoritmo SIFT e PredictSNP foram os algoritmos que tiveram a menor taxa de predição deletéria (18.7%), e conseqüentemente, os algoritmos que apresentaram a menor acurácia de predição nesse estudo (Figura 4). Esse resultado aponta para a fragilidade do uso individualizado de algoritmos de predição funcional.

**Figura 3. Predição funcional das variantes da VCP por algoritmo utilizado.**

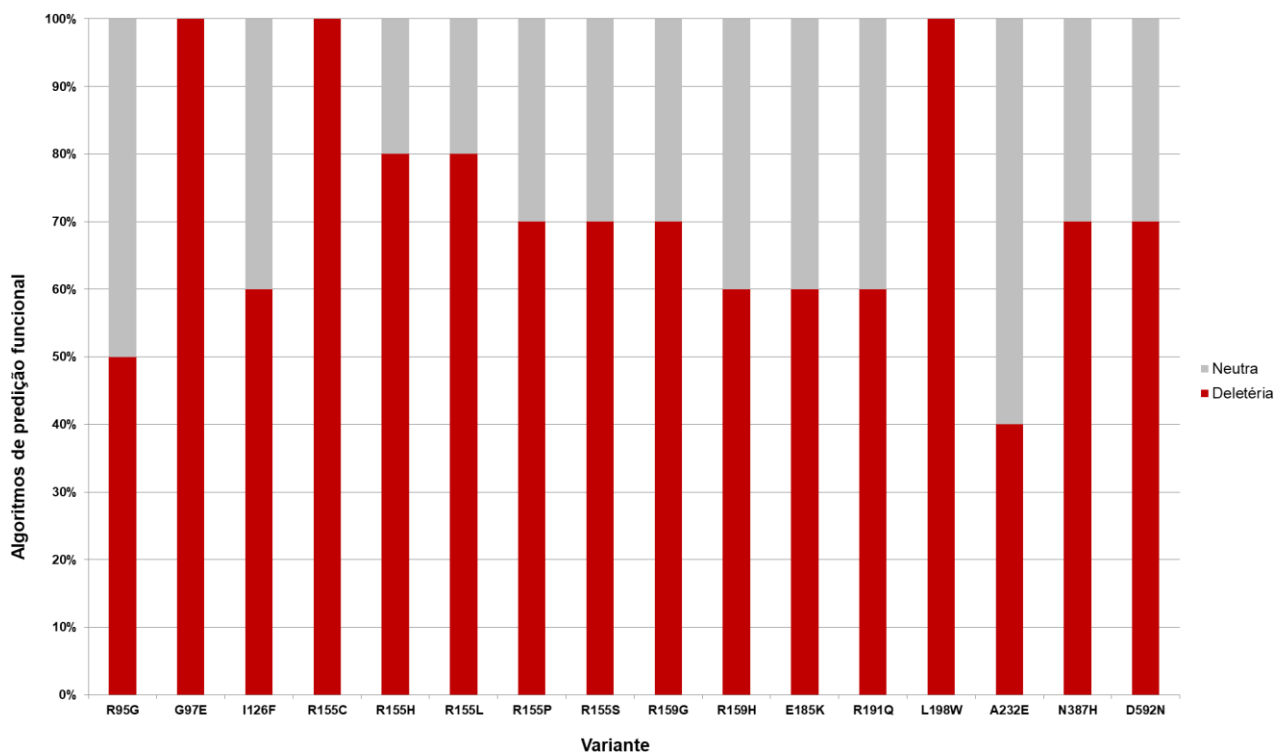


A proporção de variantes preditas como deletórias e neutras para cada algoritmo estão representadas pela barra vermelha e cinza, respectivamente.

As mutações R155C, G97E e L198W foram preditas como deletórias por todos os algoritmos utilizados (Figura 4). Na literatura consultada, essas variantes já foram associadas com o desenvolvimento de demência frontotemporal e doença de Paget, corroborando esse resultado. Já a mutação A232E, sabidamente deletéria e também associada ao desenvolvimento de demência frontotemporal e doença de Paget, obteve a menor taxa de predição deletéria (40%), indicando baixa taxa de acerto dos algoritmos para essa mutação.



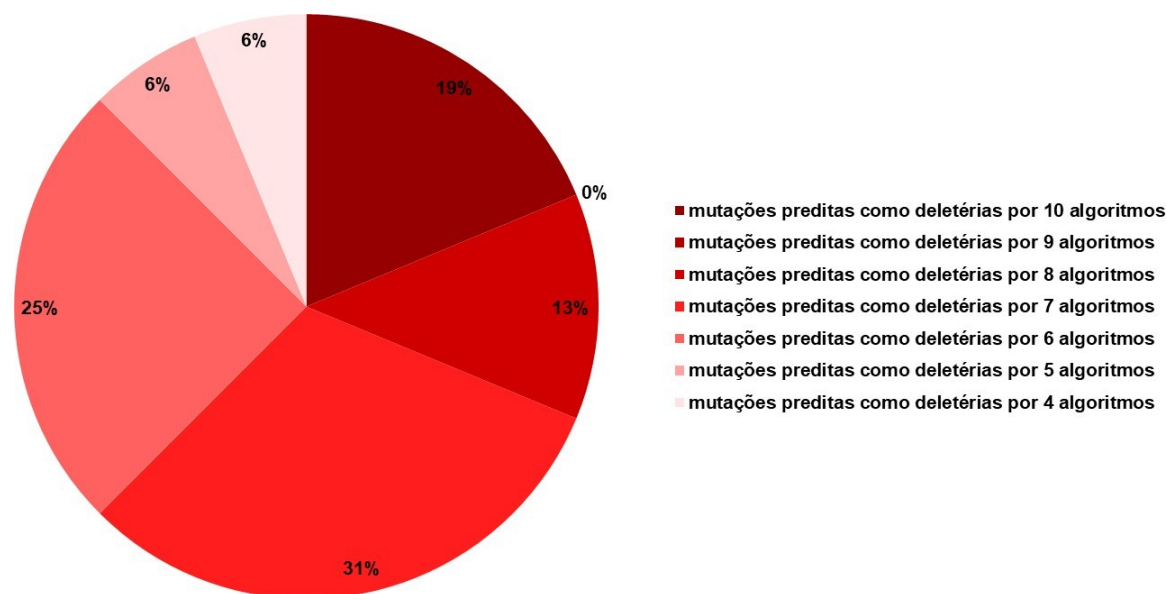
Figura 4. Predição funcional de cada uma das mutações da VCP.



A proporção de predições deletérias e neutras para cada mutação estão representadas pela barra vermelha e cinza, respectivamente.

Todas as mutações estudadas foram preditas como deletérias por pelo menos quatro algoritmos de predição utilizados (Figura 5). Além disso, cerca de 88% de todas as mutações foram preditas como deletérias por mais da metade dos algoritmos simultaneamente. Os resultados da análise de predição funcional apresentados nesse estudo, portanto, reforçam a importância do uso combinado de algoritmos para a obtenção de maior acurácia na predição funcional. Isso porque esses algoritmos utilizam estratégias e abordagens diferentes para a predição e não existe um método padrão ouro para esse tipo de análise. Os algoritmos de predição funcional são amplamente utilizados para a triagem e seleção de mutações com maior probabilidade de serem deletérias, a fim de que estas sejam priorizadas e estudadas mais a fundo em bancada molhada, economizando tempo e recursos (PEREIRA *et al.*, 2021).

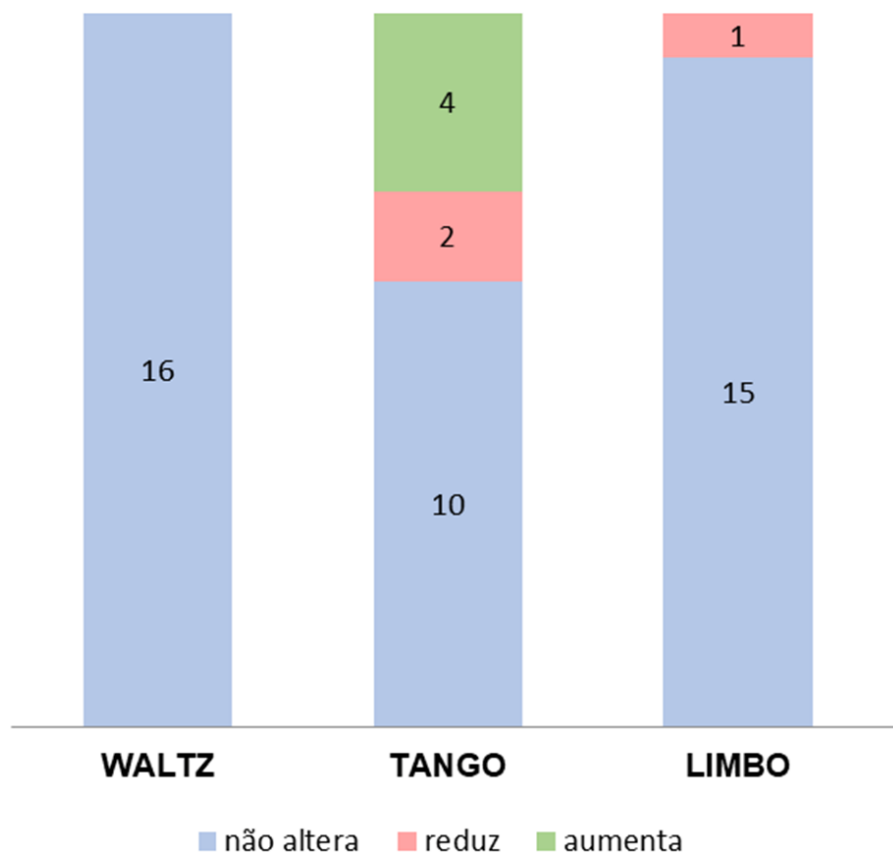
Figura 5. Porcentagem de variantes preditas como deletérias por 0 a 10 algoritmos.



No gráfico de setores, quanto *mais escura* a cor na escala de vermelho, *maior* a quantidade de algoritmos que predisseram aquelas mutações como deletérias.

Como mostrada na Figura 6, a análise do SNPEffect4.0 indicou que nenhuma mutação foi predita por afetar a propensão amilóide da proteína (WALTZ). As mutações R155C, R155L, R155S e L198W, por sua vez, foram preditas por aumentar a tendência de agregação proteica da proteína, ao passo que as mutações R155G e R159H reduzem a tendência à agregação proteica. Por fim, a mutação N387H foi predita por reduzir a tendência de ligação a chaperonas (LIMBO).

**Figura 6. Predição de agregação proteica (TANGO), propensão amiloide (WALTZ) e tendência de ligação à chaperonas (LIMBO) para as variantes da VCP.**



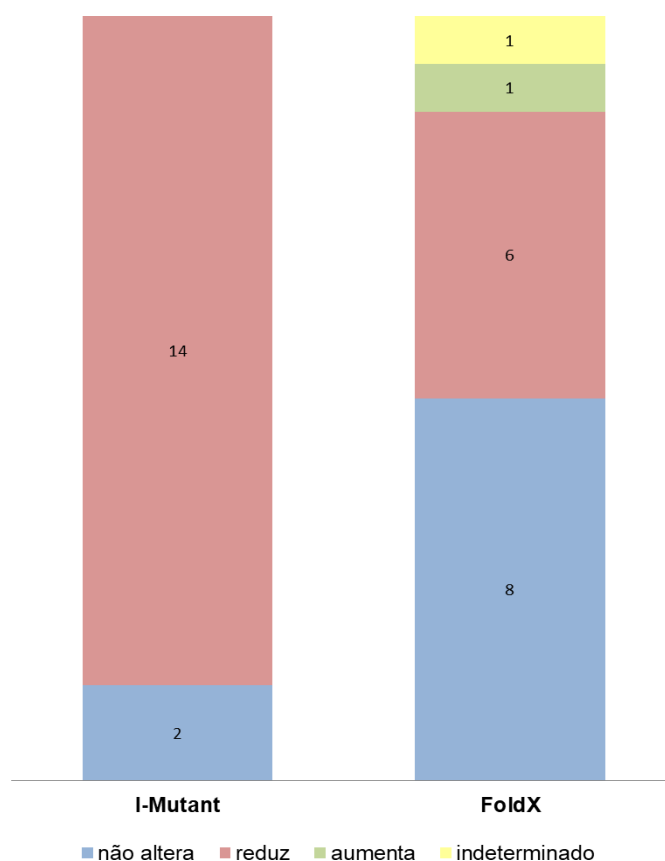
A barra azul representa mutações que não alteraram o parâmetro analisado, a barra vermelha representa mutações que reduziram o parâmetro analisado, e a barra verde representa mutações que aumentam o parâmetro analisado.

A análise de predição de estabilidade no I-Mutant indicou que 87% das mutações foram preditas como redutoras de estabilidade, ao passo que 13% não alteraram a estabilidade da proteína. Já para o Fold-X, metade das mutações não alteraram a estabilidade e apenas 37% das mutações reduziram esse parâmetro. Apenas a mutação R155P foi predita por aumentar a estabilidade da VCP para o Fold-X. A análise do Fold-X foi inconclusiva para a mutação D592N.

As mutações R95G, R155S, E185K, R191Q, e L198W foram preditas como redutoras de estabilidade para o I-Mutant e Fold-X simultaneamente. Já a mutação A232E foi predita por não alterar a estabilidade da proteína de acordo

com a análise dos dois algoritmos. Apesar da diferença entre as predições do Fold-X e I-Mutant para as variantes da VCP, apenas a predição para a variante R155P foi opostas, isto é: predita por reduzir a estabilidade em um algoritmo e aumentar a estabilidade no outro algoritmo utilizado. A divergência entre os resultados da predição de estabilidade podem ser atribuídas aos métodos utilizados pelo I-Mutant e Fold-X para realizar suas análises. O FoldX utiliza um campo de força treinado em banco de dados de proteínas engenheiradas para calcular alterações de energia livre em mutações e predizer o respectivo impacto na estabilidade (SCHYMKOWITZ *et al.*, 2005). Já o I-Mutant é baseado em *Support Vector Machine* (método de aprendizado de máquinas) treinado em banco de dados de estruturas proteicas determinadas experimentalmente (CAPRIOTTI; FARISELLI; CASADIO, 2005).

**Figura 7. Predição de estabilidade para as variantes da VCP.**



A barra azul representa mutações que não alteraram a estabilidade, a barra vermelha representa mutações que reduziram a estabilidade, e a barra verde representa mutações que aumentaram a estabilidade. A barra amarela representa predições inconclusivas para a mutação analisada.

### 4.3 Modelagem estrutural da proteína nativa

A modelagem computacional da proteína VCP nativa, retornou 17 modelos tridimensionais, conforme mostrado na Tabela 3. Dentre os modelos gerados, dez foram completamente modelados em extensão e enovelamento (do Inglês – “*folding*”). Os modelos completos foram gerados pelo algoritmo I-Tasser e Robetta, ambos algoritmos que utilizam abordagens de modelagem por *threading* (KIM; CHIVIAN; BAKER, 2004; YANG; ZHANG, 2015). Os sete modelos gerados pelo SwissModel, Mholline e Robetta (pelo método de domínio) foram incompletos, e portanto, desconsiderados para futuras análises.

Tabela 3. Modelagem estrutural da proteína VCP.

Algoritmos	Modelo	Tamanho	Folding
Robetta (threading)	1	806	Completo
Robetta (threading)	2	806	Completo
Robetta (threading)	3	806	Completo
Robetta (threading)	4	806	Completo
Robetta (threading)	5	806	Completo
I-Tasser	1	806	Completo
I-Tasser	2	806	Completo
I-Tasser	3	806	Completo
I-Tasser	4	806	Completo
I-Tasser	5	806	Completo
SwissModel	4	748	Completo
Robetta (domain)	4	773	Completo
Robetta (domain)	2	773	Completo
Robetta (domain)	3	773	Completo
Robetta (domain)	4	773	Completo
Robetta (domain)	5	773	Completo
Mholline2	4	806	Incompleto

Modelos incompletos em extensão e/ou enovelamento estão tachados e o respectivo erro destacado em vermelho.

Os modelos tridimensionais completos da proteína VCP nativa foram então submetidos ao alinhamento estrutural no servidor TM-Align com o fragmento 5FTK, que retornou valores de RMSD e TM-score para cada alinhamento, mostrados na Tabela 4. Os modelos 4 do Robetta, bem como os

modelos 2 e 4 do I-Tasser não apresentaram similaridade estrutural com o fragmento experimental da proteína VCP (5FTK), uma vez que seus valores de RMSD foram maiores que 2Å. Considerando que a similaridade estrutural é indispensável para garantir a acurácia e validar estruturas teóricas, os referidos modelos foram então desconsiderados para as etapas subsequentes de validação.

**Tabela 4. Alinhamento estrutural dos modelos computacionais da VCP nativa e o fragmento 5FTK do PDB.**

Algoritmos	Modelo	TM-score (>0.5)	RMSD (<2Å)	Resíduos Alinhados
Robetta (threading)	1	0.97674	1.46Å	723
Robetta (threading)	2	0.97563	1.50Å	723
Robetta (threading)	3	0.97334	1.57Å	723
Robetta (threading)	4	<del>0.53527</del>	<del>5.99Å</del>	723
Robetta (threading)	5	0.97925	1.38Å	723
I-Tasser	1	0.98691	1.09Å	723
I-Tasser	2	<del>0.53234</del>	<del>7.49Å</del>	723
I-Tasser	3	0.98681	1.09Å	723
I-Tasser	4	<del>0.52970</del>	<del>7.47Å</del>	723
I-Tasser	5	0.98689	1.09Å	723

Modelos que tiveram no alinhamento valores de RMSD maiores que 2Å e TM-score menores que 0,5 e, portanto, não apresentaram similaridade estrutural com o fragmento experimental da proteína VCP foram tachados, e seus respectivos erros destacados em vermelho

Sete modelos apresentaram similaridade ao fragmento experimental da proteína VCP, e foram submetidos a algoritmos de validação para análise da qualidade estrutural, cujos resultados estão mostrados na Tabela 5. A fim de auxiliar a comparação, os pontos de corte para os valores de parâmetro necessários à validação da estrutura estão mostrados na tabela junto ao nome de cada algoritmo. Cinco modelos foram reprovados nas análises de qualidade estrutural por pelo menos um algoritmo de validação (isto é, não apresentaram valores de parâmetro dentro do ponto de corte preconizado pelo algoritmo), indicando que esses modelos apresentavam baixa qualidade em algum parâmetro estrutural analisado. Apenas os modelos 1 e 5 do Robetta (*threading*) foram aprovados por todos os algoritmos de validação, sugerindo que esses modelos apresentaram alta qualidade em todos os parâmetros

estruturais investigados. Dentre essas duas estruturas, o modelo 5 do Robetta apresentou os valores de parâmetro indicativos de maior qualidade estrutural na análise de validação, sendo, portanto, selecionado para as etapas subsequentes desse estudo.

**Tabela 5. Validação estrutural dos modelos computacionais da VCP nativa.**

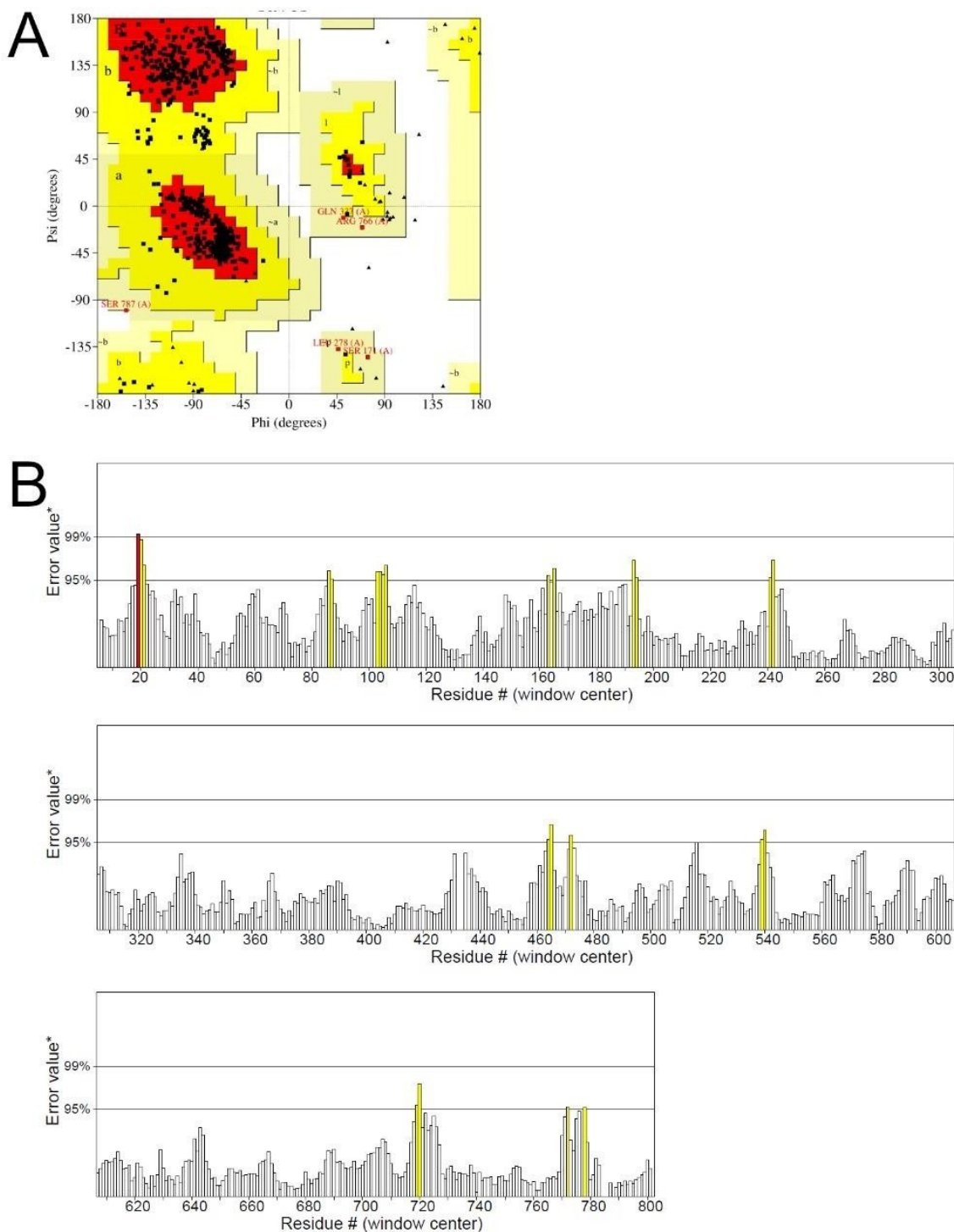
Algoritmos	Modelo	ERRAT (>95%)	Verify-3D (>80%)	PROCHECK (fav>90%/ ñ.perm≅0%)	Prosa (Z-score/ faixa de qualidade)	QMEAN (QMEAN-score/ faixa de qualidade)	MolProbity (score<2)
Robetta (threading)	1	96,84%	93.55%	90.1%/0.3%	-12,88/Difração de Raios-X	1.79/dentro	1
Robetta (threading)	2	93,05%	94.42%	90.1%/0.4%	-13,04/Difração de Raios-X	1.97/dentro	1.26
Robetta (threading)	3	*	89.83%	87.8%/0.04%	-13,17/Difração de Raios-X	1.22/dentro	1.47
Robetta (threading)	5	96,95%	90.07%	90.4%/0.01%	-13,79/Difração de Raios-X	1.77/dentro	0.91
I-Tasser	1	89,14%	87.84%	72.2%/1.9%	-11,71/Difração de Raios-X	-5.69/fora	3.10
I-Tasser	3	90,18%	88.21%	74.7%/2.0%	-12,37/Difração de Raios-X	-5.30/fora	2.74
I-Tasser	5	86,84%	91.94%	74.2%/2.0%	-12,41/Difração de Raios-X	-5.40/fora	2.98

Modelos que foram reprovados nas análises de qualidade estrutural por pelo menos um dos algoritmos de validação utilizados foram tachados, e o parâmetro reprovado destacado em vermelho. O modelo aprovado em todos os algoritmos de validação e que apresentou valores de parâmetro indicativos de maior qualidade estrutural está destacado em verde. Os pontos de corte para os valores de parâmetro necessários à validação da estrutura estão mostrados na tabela junto ao nome do algoritmo correspondente. Análises que não retornaram resultado estão marcadas pelo asterisco.

A validação individual do modelo 5 do robetta é mostrada nas Figuras 8, 9 e 10. O PROCHECK utiliza um gráfico de Ramachandran para analisar a qualidade estereoquímica da estrutura em questão. Para que estruturas sejam consideradas de alta qualidade estereoquímica, elas precisam ter mais de 90% dos aminoácidos em regiões favoráveis no gráfico de Ramachandran do PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 1993). O modelo selecionado da VCP apresentou 90,40% dos resíduos em regiões favoráveis e, portanto, possui alta qualidade estereoquímica (Figura 8A). O ERRAT estima a probabilidade de erro para cada aminoácido na estrutura e gera um fator geral de qualidade. Estruturas de alta resolução depositadas no PDB geralmente têm um fator de qualidade em torno de 95% (COLOVOS; YEATES, 1993). O modelo teórico da

VCP apresentou 96,95% de fator de qualidade do ERRAT, valor semelhante ao de estruturas experimentais de alta resolução (Figura 8B).

Figura 8. Validação do modelo teórico da VCP no PROCHECK e ERRAT.



(A) Gráfico de Ramachandran do PROCHECK utilizado para a validação do modelo da VCP selecionado. Cada aminoácido está representado no gráfico por quadrados pretos, baseado na disposição de seus ângulos de torção Phi e Psi. Regiões favoráveis estão representadas em vermelho, regiões permitidas estão representadas em amarelo e bege, ao passo que regiões não permitidas estão representadas em branco. (B) Gráfico de barras contendo a porcentagem



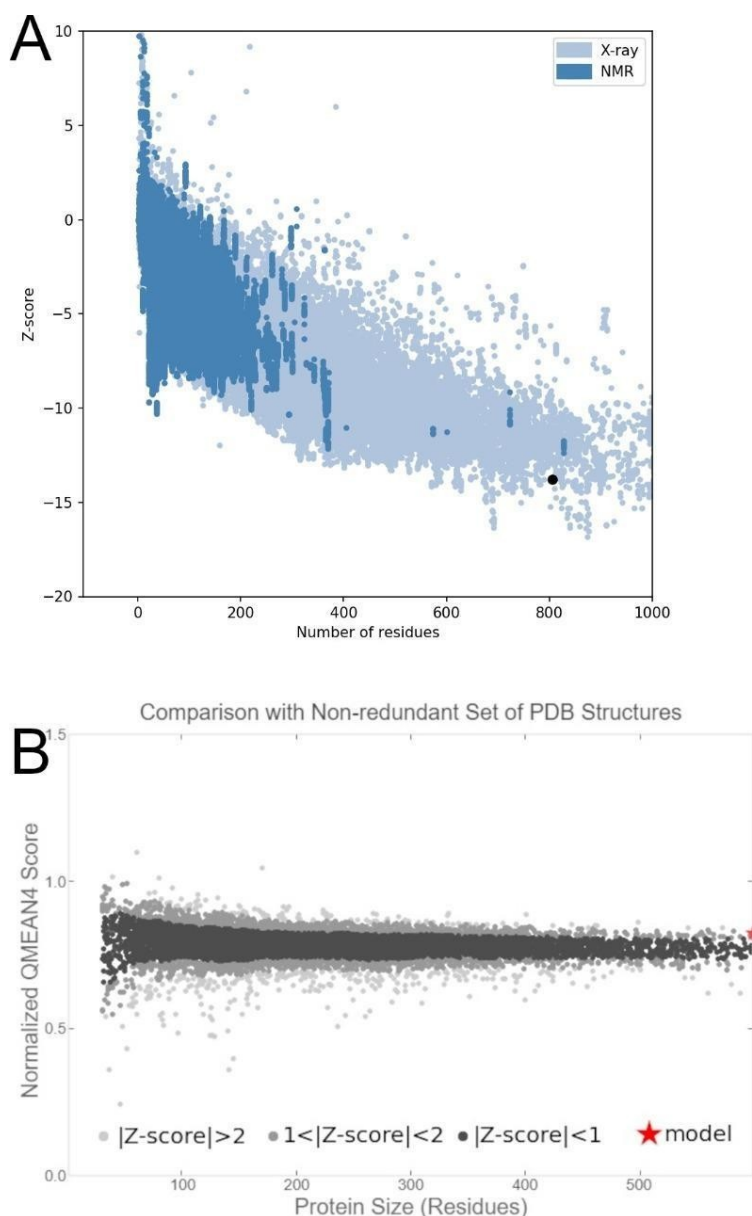
de erro de cada aminoácido da proteína utilizado na validação do ERRAT. Aminoácidos com probabilidade de erro menor que 95% estão representados pelas barras brancas, ao passo que aminoácidos com probabilidade de erro maior que 95% estão representados pelas barras amarelas, e aminoácidos com probabilidade de erro maior que 99% estão representados pelas barras vermelhas.

O ProsaWeb é uma ferramenta de análise da qualidade de estruturas de proteína baseado em informações obtidas de estruturas tridimensionais de proteínas depositadas no Protein Data Bank. O ProSa estima a qualidade global do modelo de interesse e o compara com o fator de qualidade calculado para todas as estruturas depositadas no PDB. Esse fator de qualidade geral, Z-score, é estimado baseado no desvio da energia total da estrutura em relação a uma distribuição (ótima) de energia derivada de conformações aleatórias. (SIPPL, 1993; WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). O modelo computacional da VCP apresentou Z-score dentro da faixa de qualidade esperada para estruturas experimentais determinadas por ressonância magnética nuclear (Figura 9A). Já o QMEAN, analisa aspectos geométricos e físico-químicos para calcular a pontuação de qualidade geral da estrutura (QMEAN-score), que é plotado em um gráfico contendo o QMEAN-score de quase 10.000 estruturas de alta resolução determinadas experimentalmente (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2011). O modelo selecionado da VCP apresentou um valor de QMEAN-score dentro da faixa de qualidade de estruturas experimentais de alta resolução (Figura 9B).

O Verify-3D é um algoritmo que analisa a compatibilidade estrutura sequência de cada aminoácido da proteína e atribui um valor de qualidade local (3D-1D-score). Aminoácidos que possuem compatibilidade estrutura-sequência possuem 3D-1D-score (valor médio) maior que 0,2. Segundo o Verify-3D, para que uma estrutura possua alta compatibilidade estrutura sequência, é preciso que esta tenha mais de 80% de seus aminoácidos com 3D-1D-score (valor médio) maior que 0,2 (EISENBERG, D; LÜTHY; BOWIE, 1997). Nesse sentido, o modelo selecionado da VCP foi considerado de alta compatibilidade estrutura sequência, dado que apresentou 90,07% de seus aminoácidos com 3D-1D-score maior que 0,2 (Figura 10A). O MolProbity, por sua vez, é um método que analisa o contato entre todos os átomos e aspectos geométricos para calcular

um valor de qualidade geral da estrutura (MolProbity-score). Estruturas de alta resolução do PDB possuem valores de MolProbity-score  $\leq 2$ . O modelo computacional da VCP apresentou valor de MolProbity-score de 0,91 (Figura 10B), equiparado ao valor de qualidade de estruturas experimentais de alta resolução (WILLIAMS et al., 2018).

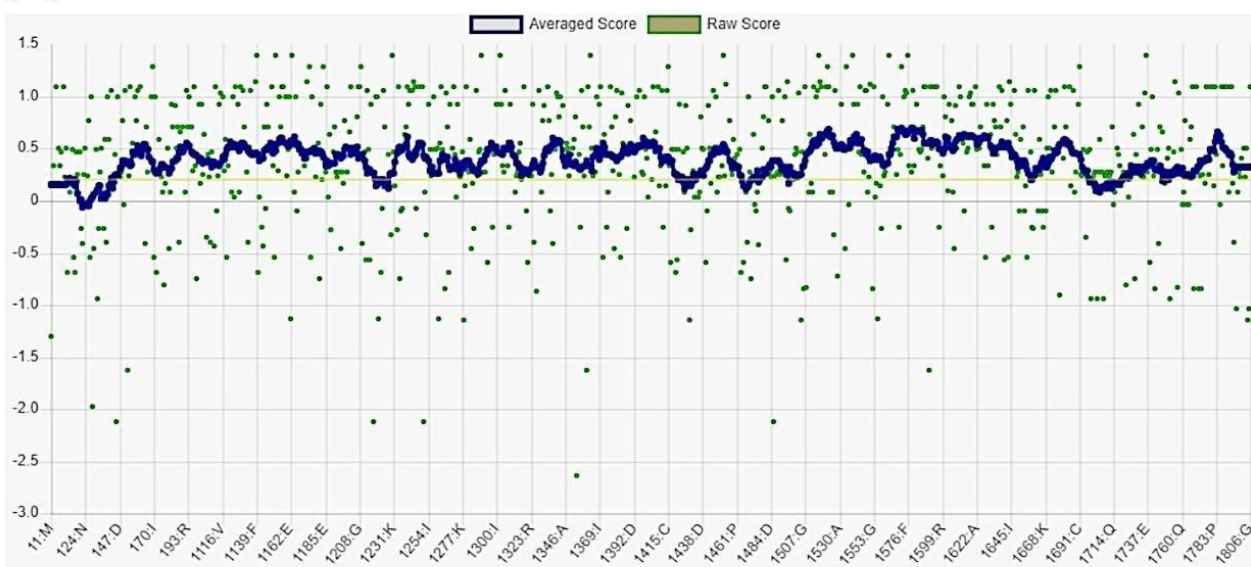
**Figura 9. Validação do modelo teórico da VCP no ProSa e QMEAN.**



(A) Gráfico de validação do ProSA contendo os valores de Z-score de todas as estruturas proteicas contidas no PDB determinadas por cristalografia de raios-X (azul escuro) e ressonância magnética nuclear (azul claro). O valor de Z-score do modelo da VCP está representado pelo ponto preto. (B) Gráfico de validação do QMEAN contendo os valores de QMEAN-score de todas as 9766 estruturas experimentais de alta resolução do PDB. O valor de QMEAN-score do modelo da VCP está representado por uma estrela vermelha.

Figura 10. Validação do modelo teórico da VCP no ProSa e QMEAN.

A



B

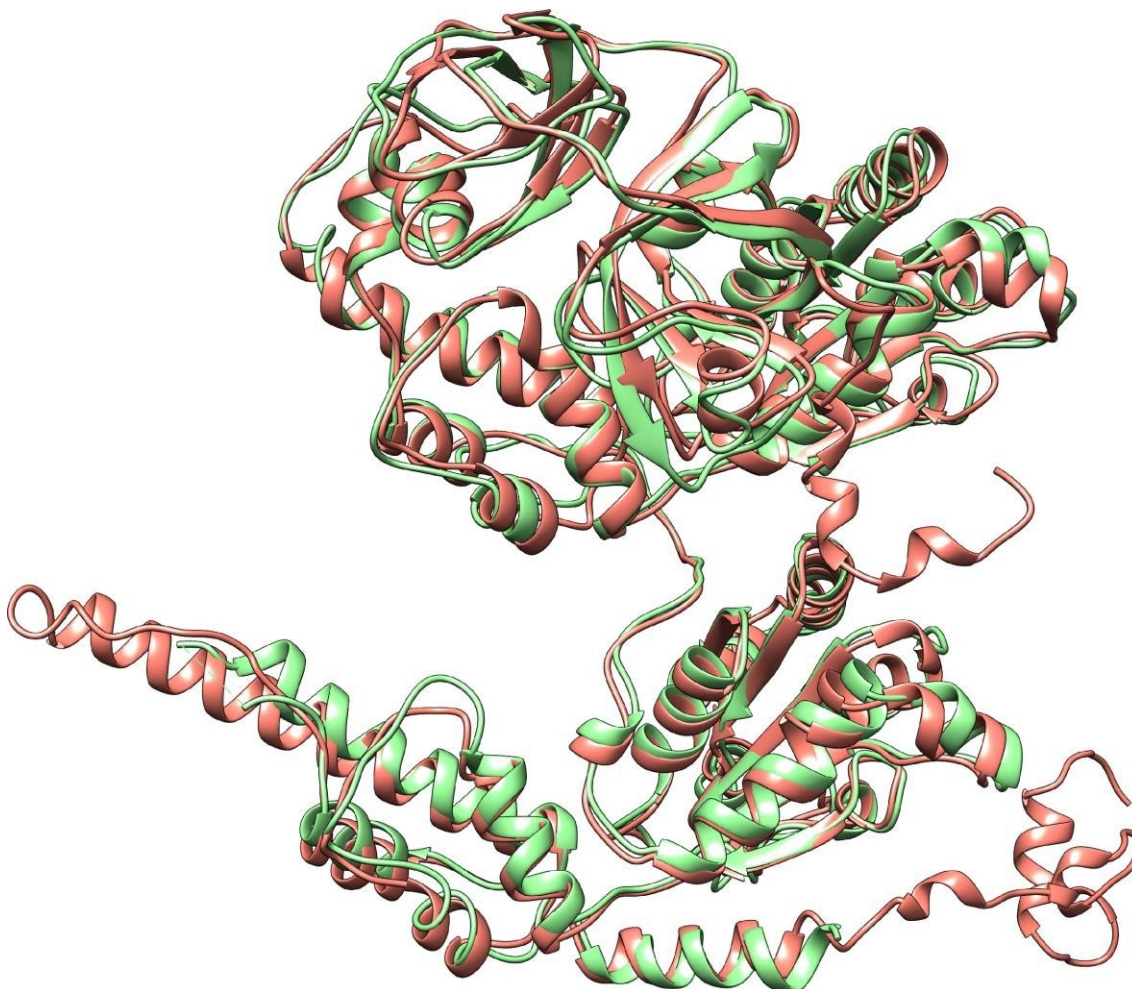
All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	0.8	99 <sup>th</sup> percentile* (N=1784, all resolutions)
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.		
Protein Geometry	Poor rotamers	0	0.00% Goal: <0.3%
	Favored rotamers	678	100.00% Goal: >98%
	Ramachandran outliers	4	0.50% Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	781	97.14% Goal: >98%
	Rama distribution Z-score	0.54 ± 0.29	Goal: abs(Z score) < 2
	MolProbity score	0.91	100 <sup>th</sup> percentile* (N=27675, 0Å - 99Å)
	Cβ deviations >0.25Å	1	0.13% Goal: 0
Bad bonds:	2 / 6369	0.03%	Goal: 0%
	Bad angles:	18 / 8597	0.21% Goal: <0.1%
Peptide Omegas	Cis Prolines:	2 / 43	4.65% Expected: ≤1 per chain, or ≤5%
	Twisted Peptides:	1 / 805	0.12% Goal: 0
Low-resolution Criteria	CaBLAM outliers	24	3.0% Goal: <1.0%
	CA Geometry outliers	8	1.00% Goal: <0.5%
Additional validations	Chiral volume outliers	0.956	
	Waters with clashes	0/0	0.00% See UnDowser table for details

(A) Gráfico de validação do Verify-3D, no qual as pontuações de 3D-1D-score são plotados para cada aminoácido da proteína na forma de valor médio (pontos azuis) e valor bruto (ponto verde). A linha amarela corresponde ao ponto de corte do algoritmo para os valores médios de 3D-1D-score. (B) Quadro contendo os valores de pontuação para cada parâmetro analisado pelo MolProbity e os valores gerais de qualidade da estrutura (MolProbity-score).

Dessa maneira, o modelo 5 do Robetta (*threading*) foi validado, devido à sua similaridade à estrutura experimental da VCP humana (PDB ID: 5FTK), sugerida pelos valores de RMSD e TM-score do alinhamento no TM-Align, além dos valores de pontuação de qualidade geral recebidos nos seis algoritmos de validação estrutural utilizados. A inspeção visual do alinhamento,

mostrada na Figura 11, reafirma a similaridade estrutural do modelo selecionado com a estrutura 5FTK.

**Figura 11. Alinhamento estrutural do modelo validado da VCP (rosa) com a estrutura experimental 5FTK (verde).**

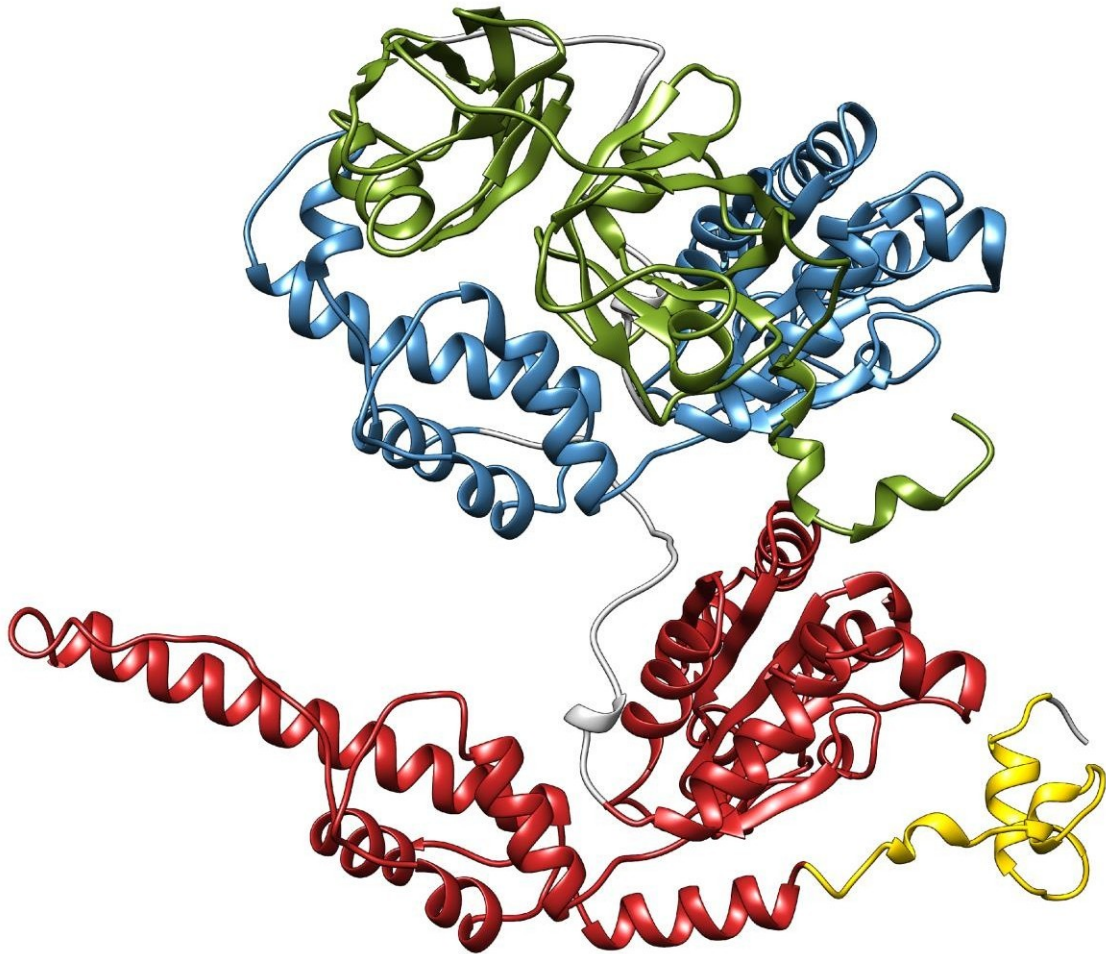


Regiões estruturadas em folhas-beta estão representadas por setas, ao passo que regiões estruturadas em alpha-hélices estão representadas por hélices.

A estrutura tridimensional completa e validada da proteína VCP humana, mostrada na Figura 12, é inédita. Conhecer a estrutura tridimensional completa da proteína VCP, é um importante fator para atingir o alvo farmacológico específico para a ELA (KAKIZUKA, 2015), poderia fornecer bases importantes para o desenho racional de novos fármacos baseado em estruturas (ANDERSON, 2003), sobretudo de fármacos voltados para o tratamento de ELA.



**Figura 12. Modelo teórico validado da proteína VCP humana.**



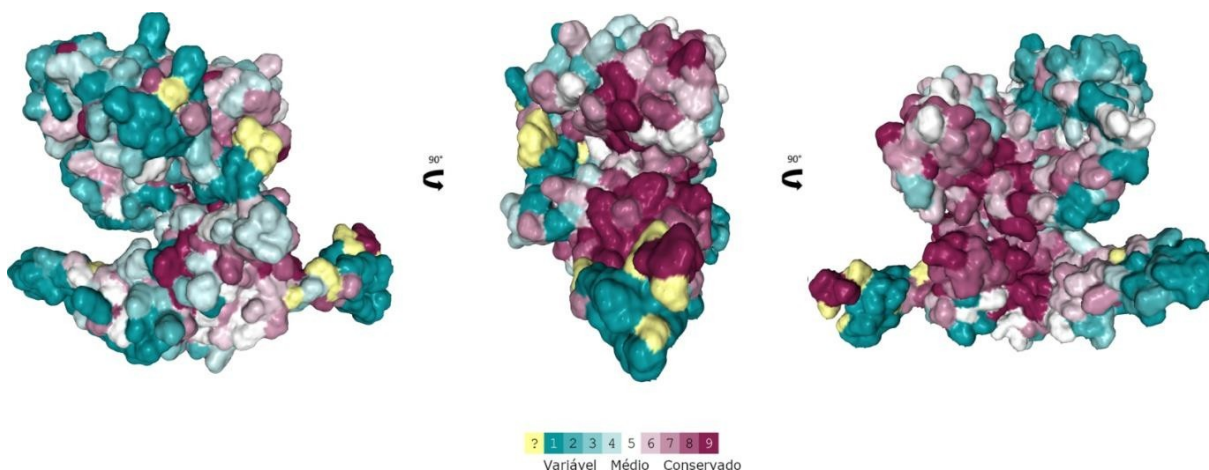
Regiões estruturadas em folhas-beta estão representadas por setas, ao passo que regiões estruturadas em alpha-hélices estão representadas por hélices. Os domínios N-terminal, D1, D2 e C-terminal estão coloridos de verde, azul, vermelho e amarelo, respectivamente

#### **4.4 Análise de conservação evolutiva**

O modelo teórico validado da VCP humana foi submetido ao servidor ConSurf, que estimou o grau de conservação evolutiva de cada aminoácido (Figura 13) baseado na relação filogenética existente entre a proteína submetida e suas sequências homólogas. O servidor ConSurf utiliza uma representação gráfica em que os valores de conservação de cada aminoácido são associados a um esquema de coloração e projetados na superfície da proteína, variando de um e azul ciano, representando posições mais variáveis,

à nove e bordô, representando posições mais conservadas evolutivamente (ASHKENAZY *et al.*, 2016).

**Figura 13. Análise de conservação da proteína VCP no ConSurf.**



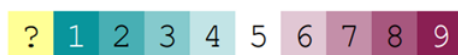
Representação da conservação evolutiva em três ângulos diferentes da proteína VCP. Cada aminoácido da proteína está colorido conforme a escala do ConSurf e projetado na superfície da proteína. A barra de cores mostra o grau de conservação relacionado ao esquema de coloração do ConSurf. Os aminoácidos coloridos em amarelo não receberam valores de conservação em função de dados insuficientes.

Aminoácidos funcionalmente importantes para a proteína geralmente são conservados ao longo da evolução em função de maior pressão seletiva. Nesse sentido, a importância biológica de um aminoácido pode ser associada ao seu nível de conservação (XIONG, 2006). Substituições de aminoácidos em posições conservadas da sequência, portanto, tem maior probabilidade de ser deletério para a proteína, e levar ao desenvolvimento de patologias (CHOI *et al.*, 2012). Os graus de conservação de cada posição da proteína afetada por mutações estão mostrados na Tabela 6. Curiosamente, todas as mutações compiladas da VCP, embora sabidamente associadas ao desenvolvimento de patologias (IKEDA *et al.*, 2020; BAYRAKTAR *et al.*, 2016; SURAMPALLI ET AL., 2017; SCHÜTZ; RENNELLA; KAY, 2017; RIJAL *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2010; HALAWANI *et al.*, 2009; RAMOS-CAMPOY *et al.*, 2020; GONZALEZ *et al.*, 2014; WATTS, Giles D J *et al.*, 2004; WATTS, G. D.G. *et al.*, 2007; JOHNSON *et al.*, 2010; S. SPINA ET AL, 2013; BENATAR *et al.*, 2013; HALAWANI *et al.*, 2009; KIMONIS *et al.*, 2008; RABOUILLE *et al.*, 1995;

HUANG *et al.*, 2020; JERATH *et al.*, 2015; MATSUBARA *et al.*, 2016), afetaram posições variáveis e de média conservação da proteína.

**Tabela 6: Análise da conservação evolutiva no ConSurf.**

Posição	Mutação	Grau de Conservação
95	R95G	5
97	G97E	4
126	I126F	1
155	R155C, R155H, R155L, R155P, R155S	5
159	R159G, R159H	3
185	E185K	2
191	R191Q	1
198	L198W	1
232	A232E	3
387	N387H	3
592	D592N	2



Variável Médio Conservado

As cores variam de 1 e azul turquesa à 9 e bordô. Posições não classificadas pelo servidor estão representadas em amarelo.

A análise de conservação da VCP por domínio, mostrada na Figura 14, indica que os domínios D1 e D2 são compostos majoritariamente por aminoácidos conservados, ao passo que o domínio N e C-terminal são compostos, sobretudo, por aminoácidos variáveis.

Figura 14. Conservação evolutiva da VCP por domínio.



Os domínios N-terminal, D1, D2, e C-terminal estão destacados em: verde, azul, vermelho e amarelo, respectivamente. Cada aminoácido da VCP está colorido de acordo com a escala de conservação do ConSurf.



#### 4.5 Modelagem estrutural das variantes

A modelagem comparativa é, atualmente, o método de predição estrutural de maior acurácia dentre as estratégias computacionais disponíveis. A modelagem comparativa alcança níveis de precisão que, em alguns casos, são comparáveis ao de estruturas determinadas experimentalmente. Estruturas tridimensionais que possuam mais de 30% de identidade de sequência com o molde utilizado na modelagem comparativa, têm maior probabilidade de serem precisas. Neste trabalho, as variantes da VCP tiveram como molde a estrutura validada da proteína nativa (modelo 5 Robetta – *threading*), cuja única diferença consiste na substituição do aminoácido correspondente à mutação, possuindo assim, mais de 99% de identidade de sequência e, conseqüentemente elevada precisão (ESWAR *et al.*, 2006; MOREIRA *et al.*, 2013). A fim de verificar alterações estruturais, os modelos das variantes foram alinhadas à estrutura validada da VCP nativa no servidor TM-align. Os valores de RMSD e TM-score desses alinhamentos são mostrados na Tabela 7.

**Tabela 7. Alinhamento estrutural da VCP nativa e suas variantes no TM-align.**

<b>Posição</b>	<b>Mutação</b>	<b>RMSD</b>	<b>TM-score</b>
95	R95G	0,96	0,9912
97	G97E	0,83	0,9932
126	I126F	0,68	0,9954
155	R155C	1,86	0,9792
155	R155H	1,17	0,9878
155	R155L	1,02	0,9886
155	R155P	1,23	0,9872
155	R155S	0,99	0,9909
159	R159G	1,02	0,9905
159	R159H	1,18	0,9867
185	E185K	0,65	0,9957
191	R191Q	0,54	0,9969
198	L198W	1,48	0,9827
232	A232E	0,77	0,9941
387	N387H	0,90	0,9921
592	D592N	1,15	0,9883

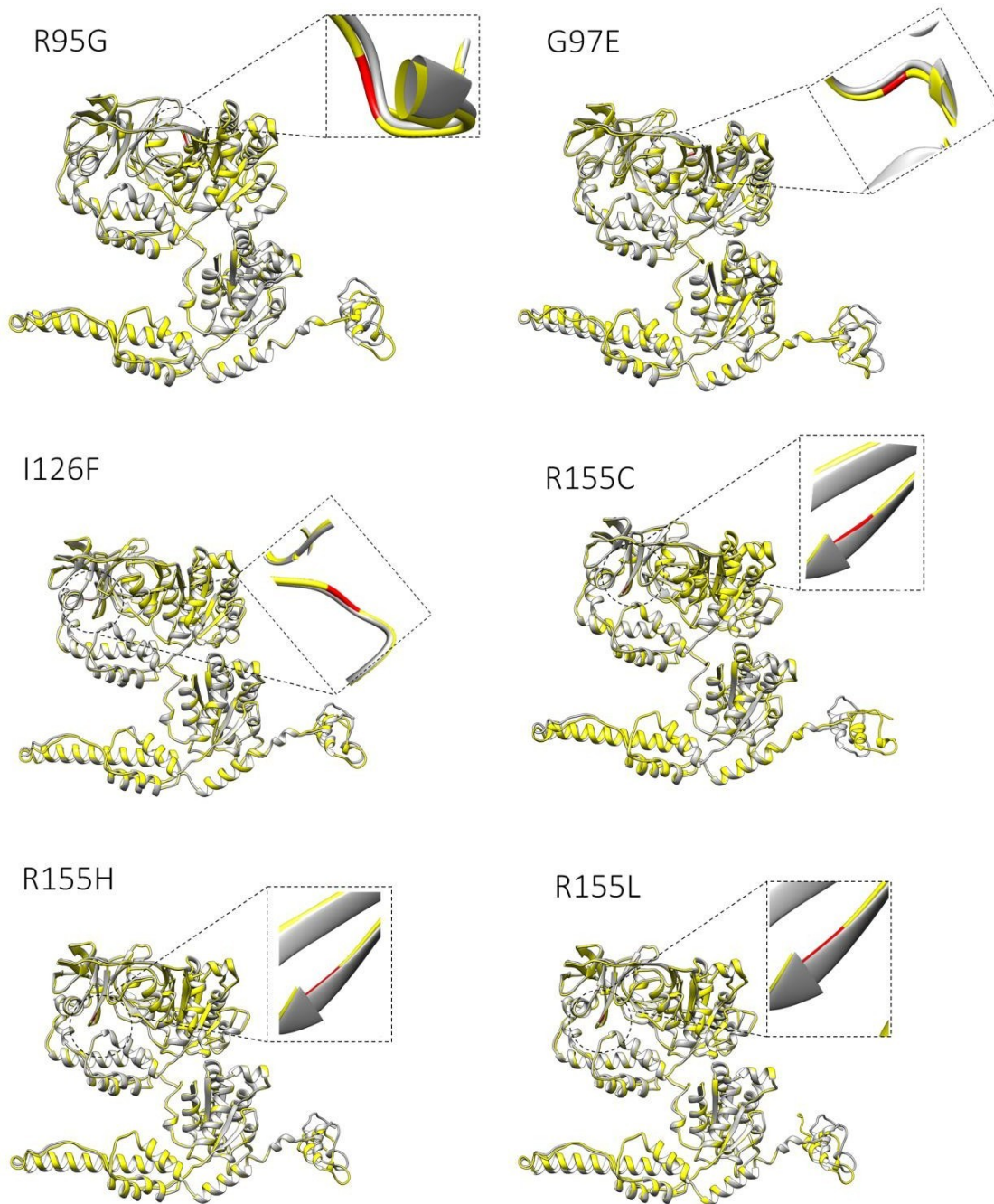
Todas as variantes analisadas apresentaram valores de RMSD maiores que 0,15Å, valor sugestivo de perturbação estrutural com provável implicação

funcional para a proteína (MOREIRA *et al.*, 2013). Isso poderia estar relacionado ao potencial patogênico dessas variantes, previamente associadas ao desenvolvimento de Demência Frontotemporal (DELLEFAVE, 2007; PERRONE; CONFORTI, 2020), Doença de Paget (CHAPMAN; FRY; KANG, 2011), Miopatia (JERATH *et al.*, 2015), Parkinson e Alzheimer (PERRONE; CONFORTI, 2020).

A inspeção visual do alinhamento entre a proteína nativa e as variantes, mostrado na Figura 15, sugere que as principais regiões afetadas por mutações na VCP são os domínios D2 e C-terminal, regiões que possuem atividade de ATPase, participam de processos catabólicos como a autofagia (BAYRAKTAR *et al.*, 2016) e são cruciais para a manutenção da estabilidade do hexâmero da VCP (CHIA *et al.*, 2012; NIWA *et al.*, 2012). A maioria das mutações da VCP já estudadas não impactaram a organização/hexamerização da proteína (MOUNTASSIF *et al.*, 2015). Entretanto, inúmeros estudos apontam para o aumento da atividade de ATPase no domínio D2 em todas as formas mutantes da proteína VCP humana já testadas (ZHANG *et al.*, 2015).

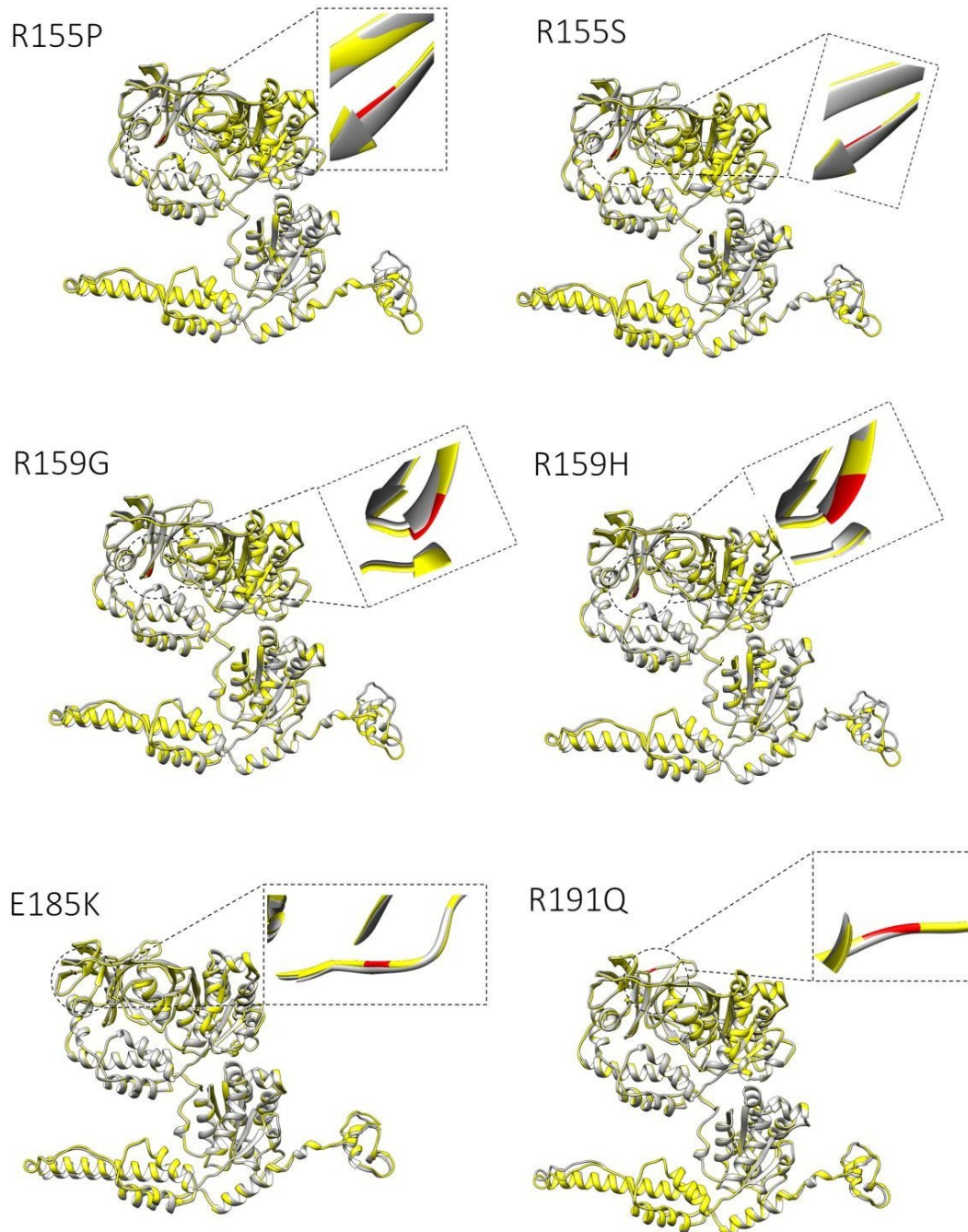
O estudo de Kakizuka, 2015, avaliou diferentes variantes da VCP sabidamente associadas ao desenvolvimento de doenças, e observou que estas induziram aumentos significativos na atividade de ATPase quando comparadas à proteína selvagem, sugerindo um possível mecanismo patológico. Além disso, o autor testou um composto com efeito inibitório sobre a atividade de ATPase da VCP, e observou que essa inibição não afetou funções celulares essenciais e ainda foi benéfica, reduzindo dano e morte celular em condições patológicas e de estresse. Embora o mecanismo exato responsável pela patogenicidade em variantes na VCP não seja totalmente compreendido, acredita-se que o aumento da atividade de ATPase ocasionado por essas mutações leve a depleção dos níveis de ATP celular, condição que inicialmente afeta a função de proteínas, e em última instância leva a ativação de vias de morte celular (KAKIZUKA, 2015).

**Figura 15. Alinhamento estrutural entre VCP nativa e as variantes R95G, G97E, I126F, R155C, R155H, e R155L no TM-align.**



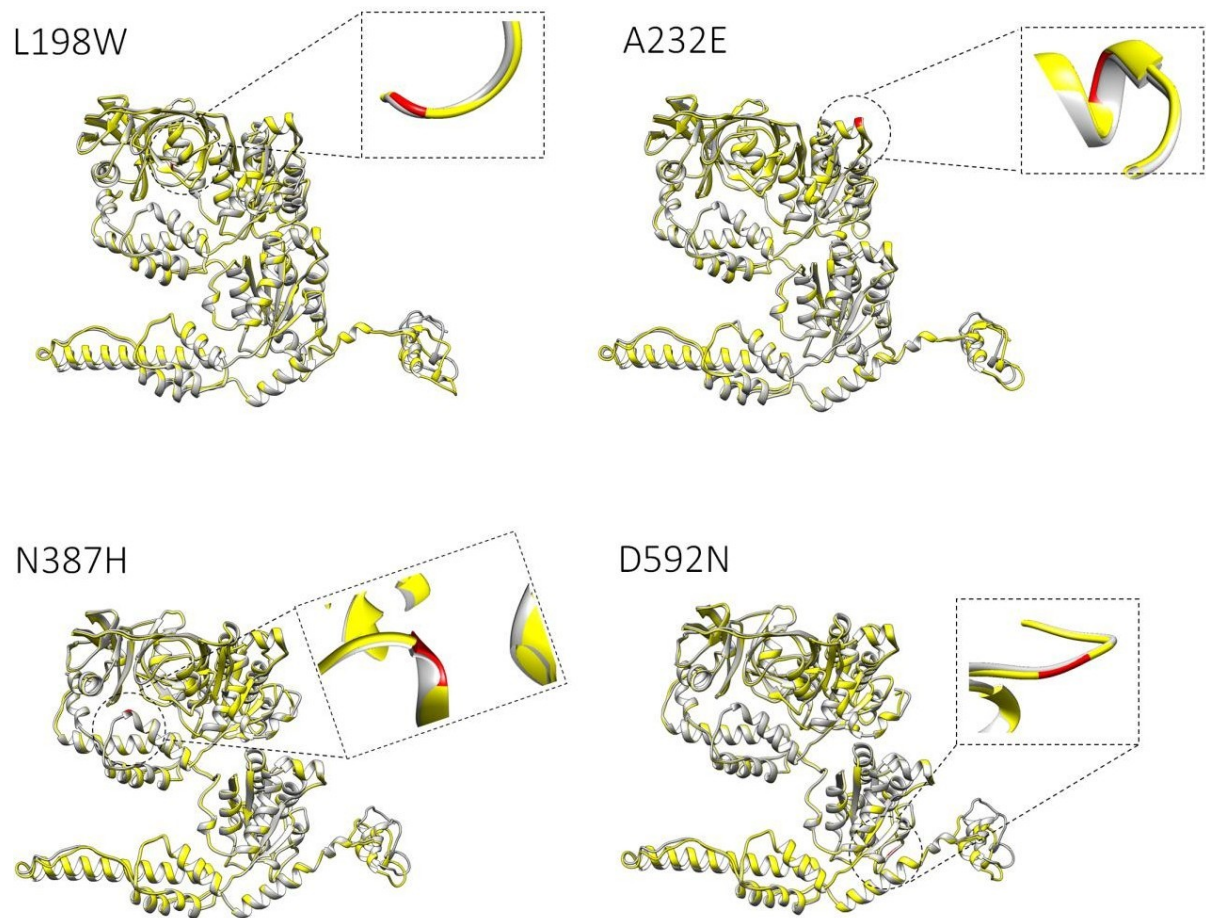
A proteína nativa está representada em cinza, ao passo que as variantes estão representadas em amarelo. O sítio da mutação está destacado em vermelho e aproximado para melhor visualização.

**Figura 16. Alinhamento estrutural entre VCP nativa e as variantes R155P, R155S, R159G, R159H, E185K, e R191Q no TM-align.**



A proteína nativa está representada em cinza, ao passo que as variantes estão representadas em amarelo. O sítio da mutação está destacado em vermelho e aproximado para melhor visualização.

**Figura 17. Alinhamento estrutural entre VCP nativa e as variantes, L198W, A232E, N387H e D592N no TM-align.**



A proteína nativa está representada em cinza, ao passo que as variantes estão representadas em amarelo. O sítio da mutação está destacado em vermelho e aproximado para melhor visualização.

MOUNTASSIF *et.al.*, 2015, determinaram por eletrocriomicroscopia a estrutura da mutante R155P, mais frequente mutação presente em pacientes com DFT-VCP, e analisaram utilizando *docking* molecular a interação dessa variante com cofatores enzimáticos conhecidos da proteína. Os resultados de tal trabalho indicaram que a mutação R155P induz uma importante alteração conformacional no domínio D2 da VCP, responsável por afetar a interação da proteína com o cofator enzimático Npl4 e facilitar o acesso do ATP ao sítio catalítico. Segundo os autores, esse achado poderia explicar o aumento tóxico da atividade de ATPase observada nessa e em demais variantes da proteína (MOUNTASSIF *et al.*, 2015). Além disso, o aumento da degradação proteolítica



sobre o domínio D2 observado em inúmeras variantes da VCP é mais uma evidência sugestiva de alteração estrutural nesse domínio (ZHANG et al., 2015).

Juntamente com os estudos citados anteriormente (KAKIZUKA, 2015; MOUNTASSIF *et al.*, 2015; ZHANG, Xiaoyi *et al.*, 2015), nossos resultados de alinhamento também suportam essa hipótese. As alterações estruturais observadas no alinhamento para os domínios D2 e C-terminal das variantes poderiam afetar as interações da VCP (RUFFALO; BAR-JOSEPH, 2019), inclusive aquelas envolvendo o ATP e possivelmente levar ao aumento tóxico da atividade de ATPase (KAKIZUKA, 2015).

## **5. CONCLUSÃO**

Foram compiladas 16 mutações da proteína VCP humana dos bancos de dados e literatura consultada. A análise de predição do efeito das mutações indicou uma elevada taxa de predições deletérias para as mutações da VCP, apontando para seus efeitos deletérios. A análise de conservação evolutiva indicou que as mutações ocorrem majoritariamente em posições variáveis e de médias conservação da VCP, e que os domínios D1 e D2 são majoritariamente conservados. A modelagem computacional gerou um modelo acurado e completo da VCP humana, inédito para a proteína. O alinhamento estrutural entre a VCP nativa e suas mutantes apontou para alterações estruturais sugestivas de implicações funcionais para a proteína, afetando sobretudo os domínios C-terminal e D2, o que poderia estar relacionado ao desenvolvimento de ELA e DFT.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU-FILHO, Antonio G; OLIVEIRA, Acary S B; SILVA, Helga C A; MEDICINA, Escola Paulista De. 1 , 1 , & 1. vol. 20, no. 1, p. 88–100, 2019. .

ADZHUBEI, IA; SCHMIDT, S; PESHKIN, L; RAMENSKY, VE; GERASIMOVA, A; BORK, P; KONDRASHOV, AS; SUNYAEV, SR. PolyPhen-2: prediction of functional effects of human nsSNPs. **Curr Protoc Hum Genet**, 2010. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.

AMBERGER, Joanna S.; HAMOSH, Ada. Knowledgebase of Human Genes and Genetic Phenotypes. **Curr Protoc Bioinformatics**, vol. 58, p. 1–20, 2018. <https://doi.org/10.1002/cpbi.27>.Searching.

ANDERSON, Amy C. The Process of Structure-Based Drug Design. **Chemistry & Biology**, vol. 10, no. September, p. 787–797, 2003. <https://doi.org/10.1016/j>.

ASH, Peter E.A.; DHAWAN, Uma; BOUDEAU, Samantha; LEI, Shuwen; CARLOMAGNO, Yari; KNOBEL, Mark; AL MOHANNA, Louloua F.A.; BOOMHOWER, Steven R.; NEWLAND, M. Christopher; SHERR, David H.; WOLOZIN, Benjamin. Heavy metal neurotoxicants induce ALS-Linked TDP-43 pathology. **Toxicological Sciences**, vol. 167, no. 1, p. 3–4, 2019. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy267>.

ASHKENAZY, Haim; ABADI, Shiran; MARTZ, Eric; CHAY, Ofer; MAYROSE, Itay; PUPKO, Tal; BEN-TAL, Nir. ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. **Nucleic Acids Research**, vol. 44, no. May, p. 344–350, 2016. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw408>.

BANG, Jee; SPINA, Salvatore; MILLER, Bruce L. Frontotemporal dementia. **The Lancet**, vol. 386, no. 10004, p. 1672–1682, 2015. DOI 10.1016/S0140-6736(15)00461-4. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00461-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00461-4).

BATEMAN, Alex. UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. **Nucleic Acids Research**, 2019. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>.

BAYRAKTAR, Oznur; ORAL, Ozlem; KOCATURK, Nur Mehpare; AKKOC,

Yunus; EBERHART, Karin; KOSAR, Ali; GOZUACIK, Devrim. IBMPFD disease-causing mutant VCP/p97 proteins are targets of autophagic-lysosomal degradation. **PLoS ONE**, vol. 11, no. 10, p. 1–19, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164864>.

BEGHI, Ettore; LOGROSCINO, Giancarlo; CHIÒ, Adriano; HARDIMAN, Orla; MITCHELL, Douglas; SWINGLER, Robert; TRAYNOR, Bryan J. The epidemiology of ALS and the role of population-based registries. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, vol. 1762, no. 11–12, p. 1150–1157, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.09.008>.

BENATAR, Michael; WUU, Joanne; CATALINA FERNANDEZ, ScM; WEIHL, Conrad C; KATZEN, Heather; STEELE, Julie; BJORN OSKARSSON, RN; PAUL TAYLOR, J. Motor neuron involvement in multisystem proteinopathy Implications for ALS Conclusion: Mutations in at least 4 genes may cause IBMPFD, and its phenotypic spectrum extends. **Neurology**, 2013. .

BENDL, Jaroslav; STOURAC, Jan; SALANDA, Ondrej; PAVELKA, Antonin; WIEBEN, Eric D.; ZENDULKA, Jaroslav; BREZOVSKY, Jan; DAMBORSKY, Jiri. PredictSNP: Robust and Accurate Consensus Classifier for Prediction of Disease-Related Mutations. **PLoS Computational Biology**, vol. 10, no. 1, p. 1–11, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003440>.

BENKERT, Pascal; BIASINI, Marco; SCHWEDE, Torsten. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, vol. 27, no. 3, p. 343–350, 2011. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>.

BENKERT, Pascal; KÜNZLI, Michael; SCHWEDE, Torsten. QMEAN server for protein model quality estimation. **Nucleic Acids Research**, vol. 37, no. Web Server, p. W510–W514, 2009. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp322>.

BHATTI, Jasvinder Singh; BHATTI, Gurjit Kaur; REDDY, P. Hemachandra. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders — A step towards mitochondria based therapeutic strategies. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, vol. 1863, no. 5, p. 1066–1077, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.010>.



BODY, Inclusion; SCLEROS, Amyotrophic Lateral; NALBANDIAN, Angèle; DONKERVOORT, Sandra; DEC, Eric; BADADANI, Mallikarjun. The Multiple Faces of Valosin-Containing Protein-Associated Diseases: The Multiple Faces of Valosin-Containing Protein-Associated Diseases: Inclusion Body Myopathy with Paget ' s Disease of Bone , Frontotemporal Dementia , and Amyotrophic Lateral Sclero. no. October, 2014. <https://doi.org/10.1007/s12031-011-9627-y>.

BONDUELLE, M. Amyotrophic lateral sclerosis. **Revue Neurologique**, vol. 138, no. 12, p. 1027–1039, 1982. .

BOTT, Nicholas T.; RADKE, Anneliese; STEPHENS, Melanie L.; KRAMER, Joel H. Frontotemporal dementia: diagnosis, deficits and management. **Neurodegenerative disease management**, vol. 4, no. 6, p. 439–454, 2014. <https://doi.org/10.2217/nmt.14.34>.

BRAUN, Ralf Josef. **Functional Proteome Analysis of Pathophysiological Variants of the AAA- ATPase Cdc48p/VCP**. 2014. 182 f. Technischen Universität München, 2014.

BUCHBERGER, Alexander; SCHINDELIN, Hermann; HÄNZELMANN, Petra. Control of p97 function by cofactor binding. vol. 589, p. 2578–2589, 2015. .

CALABRESE, Remo; CAPRIOTTI, Emidio; FARISELLI, Piero; MARTELLI, Pier Luigi; CASADIO, Rita. Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. **Human mutation**, vol. 30, no. 8, p. 1237–44, Aug. 2009. DOI 10.1002/humu.21047. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19514061>. Accessed on: 31 May 2015.

CAPRILES, Priscila V S Z; GUIMARÃES, Ana C R; OTTO, Thomas D; MIRANDA, Antonio B; DARDENNE, Laurent E; DEGRAVE, Wim M. Structural modelling and comparative analysis of homologous, analogous and specific proteins from Trypanosoma cruzi versus Homo sapiens: putative drug targets for chagas' disease treatment. **BMC genomics**, vol. 11, p. 610, 2010. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-610>.

CAPRIOTTI, Emidio; FARISELLI, Piero. PhD-SNPg: A webserver and lightweight tool for scoring single nucleotide variants. **Nucleic Acids Research**, vol. 45, no. W1, p. W247–W252, 2017. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx369>.

CAPRIOTTI, Emidio; FARISELLI, Piero; CASADIO, Rita. I-Mutant2.0: Predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. **Nucleic Acids Research**, vol. 33, no. Web Server, p. W306–W310, 2005. <https://doi.org/10.1093/nar/gki375>.

CARRASCO-RAMIRO, F.; PEIRÓ-PASTOR, R.; AGUADO, B. Human genomics projects and precision medicine. **Gene Therapy**, vol. 24, no. 9, p. 551–561, 2017. <https://doi.org/10.1038/gt.2017.77>.

CHAPMAN, Eli; FRY, Anastasia N.; KANG, Minjin. The complexities of p97 function in health and disease. **Molecular BioSystems**, vol. 7, no. 3, p. 700–710, 2011. <https://doi.org/10.1039/c0mb00176g>.

CHENG, Cheng; WEISS, Lan; TA, Lac; KIMONIS, Virginia. Expression level of R155H mRNA in the knock-in mouse model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 523, no. 4, p. 985–986, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.021>.

CHIA, Wei Sheng; CHIA, Diana Xueqi; RAO, Feng; BAR NUN, Shoshana; GEIFMAN SHOCHAT, Susana. ATP Binding to p97/VCP D1 Domain Regulates Selective Recruitment of Adaptors to Its Proximal N-Domain. **PLoS ONE**, vol. 7, no. 12, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050490>.

CHITI, Fabrizio; DOBSON, CM. Amyloid Formation, Protein Homeostasis, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. **Annual Review of Biochemistry**, vol. 86, no. 1, p. 1–42, 2017. .

CHOI, Yongwook; CHAN, Agnes P. PROVEAN web server: A tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. **Bioinformatics**, 2015. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv195>.

CHOI, Yongwook; SIMS, Gregory E.; MURPHY, Sean; MILLER, Jason R.; CHAN, Agnes P. Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. **PLoS ONE**, vol. 7, no. 10, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046688>.

CLEMEN, Christoph S.; WINTER, Lilli; STRUCKSBERG, Karl Heinz; BERWANGER, Carolin; TÜRK, Matthias; KORNBLUM, Cornelia; FLORIN, Alexandra; AGUILAR-PIMENTEL, Juan Antonio; AMARIE, Oana Veronica;

BECKER, Lore; GARRETT, Lillian; HANS, Wolfgang; MORETH, Kristin; NEFF, Frauke; PINGEN, Laura; RATHKOLB, Birgit; RÁCZ, Ildikó; ROZMAN, Jan; TREISE, Irina; ... SCHRÖDER, Rolf. The heterozygous R155C VCP mutation: Toxic in humans! Harmless in mice? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 503, no. 4, p. 2770–2777, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.08.038>.

CLEMENTINO, Vila. Estudando os Fatores Ambientais e suas Influencias na ELA. , p. 0–3, [s. d]. .

CLOUTIER, Philippe; LAVALLÉE-ADAM, Mathieu; FAUBERT, Denis; BLANCHETTE, Mathieu; COULOMBE, Benoit. A Newly Uncovered Group of Distantly Related Lysine Methyltransferases Preferentially Interact with Molecular Chaperones to Regulate Their Activity. **PLoS Genetics**, vol. 9, no. 1, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003210>.

COLOVOS, Chris; YEATES, Todd O. Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein Sci**, vol. 2, no. 9, p. 1511–1519, 1993. DOI 10.1002/pro.5560020916. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/pro.5560020916>.

CONDE, Lucía; VAQUERIZAS, Juan M.; FERRER-COSTA, Carles; DE LA CRUZ, Xavier; OROZCO, Modesto; DOPAZO, Joaquín. PupasView: A visual tool for selecting suitable SNPs, with putative pathological effect in genes, for genotyping purposes. **Nucleic Acids Research**, vol. 33, no. SUPPL. 2, p. 501–505, 2005. <https://doi.org/10.1093/nar/gki476>.

DA SILVA, Aloma Nogueira Rebello; PEREIRA, Gabriel Rodrigues Coutinho; MOREIRA, Lorena Giannini Alves; ROCHA, Catielly Ferreira; DE MESQUITA, Joelma Freire. SOD1 in amyotrophic lateral sclerosis development – in silico analysis and molecular dynamics of A4F and A4V variants. **Journal of Cellular Biochemistry**, vol. 120, no. 10, p. 17822–17830, 2019. <https://doi.org/10.1002/jcb.29048>.

DE BAETS, Greet; VAN DURME, Joost; REUMERS, Joke; MAURER-STROH, Sebastian; VANHEE, Peter; DOPAZO, Joaquin; SCHYMKOWITZ, Joost; ROUSSEAU, Frederic. SNPeffect 4.0: On-line prediction of molecular and

structural effects of protein-coding variants. **Nucleic Acids Research**, vol. 40, no. Database, p. D935–D939, 2012. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr996>.

DE CARVALHO, Mariana Dias Castela; DE MESQUITA, Joelma Freire. Structural Modeling and In Silico Analysis of Human Superoxide Dismutase 2. **PLoS ONE**, vol. 8, no. 6, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065558>.

DE SOUZA, Paulo Victor Sgobbi; PINTO, Wladimir Bocca Vieira de Rezende; CHIEIA, Marco Antônio Troccoli; OLIVEIRA, Acary Souza Bulle. Clinical and genetic basis of familial amyotrophic lateral sclerosis. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, vol. 73, no. 12, p. 1026–1037, 2015. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20150161>.

DE SOUZA ROSA, Lana; JORDÃO, Nathália Araújo; DA COSTA PEREIRA SOARES, Nathália; DE MESQUITA, Joelma Freire; MONTEIRO, Mariana; TEODORO, Anderson Junger. Pharmacokinetic, antiproliferative and apoptotic effects of phenolic acids in human colon adenocarcinoma cells using in vitro and in silico approaches. **Molecules**, vol. 23, no. 10, Oct. 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23102569>.

DELLEFAVE, Lisa. Amyotrophic Lateral Sclerosis Overview Clinical Manifestations of ALS. **Amyotrophic Lateral Sclerosis**, , p. 1–26, 2007. .

EISENBERG, D; LÜTHY, R; BOWIE, J U. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods in enzymology**, vol. 277, p. 396–404, 1997. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9379925>. Accessed on: 9 May 2016.

EISENBERG, David; LÜTHY, Roland; BOWIE, James U. VERIFY 3D: Assessment of Protein Models with Three-Dimensional Profiles. **Methods in Enzymology**, vol. 277, p. 396–404, 1997. .

ESWAR, Narayanan; WEBB, Ben; MARTI-RENOM, Marc A; MADHUSUDHAN, M S; ERAMIAN, David; SHEN, Min-Yi; PIEPER, Ursula; SALI, Andrej. **Comparative protein structure modeling using Modeller**. [S. l.: s. n.], 2006. vol. Chapter 5, . DOI 10.1002/0471250953.bi0506s15.Comparative. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471250953.bi0506s15/abstract;jsessi>

onid=E4575663E45DAFE3FD5D817CAFF4C93E.f02t03.

FACCHINETTI, Livia Dumont; ORSINI, Marco; LIMA, Marco Antonio Sales Dantas de. Os riscos do exercício excessivo na esclerose lateral amiotrófica: atualização da literatura. **Rev. bras. neurol**, vol. 45, no. 3, p. 33–38, 2009. .

FANG, Lei; HEMION, Charles; PINHO, Ana C; BENTO, Ferreira; BIPPES, Claudia C; FLAMMER, Josef; NEUTZNER, Albert. Mitochondrial function in neuronal cells depends on p97 / VCP / Cdc48-mediated quality control. vol. 9, no. February, p. 1–9, 2015. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00016>.

FÁVERO, Francis Meire; VOOS, Mariana Callil; DE CASTRO, Isac; CAROMANO, Fátima Aparecida; OLIVEIRA, Acary Souza Bulle. Epidemiological and clinical factors impact on the benefit of riluzole in the survival rates of patients with ALS. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, vol. 75, no. 8, p. 515–522, 2017. <https://doi.org/10.1590/0004-282x20170083>.

FERRAIUOLO, Laura; KIRBY, Janine; GRIERSON, Andrew J.; SENDTNER, Michael; SHAW, Pamela J. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, vol. 7, no. 11, p. 616–630, 2011. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.152>.

FGA, Simone Palermo; LIMA, José Mauro Braz de; ALVARENGA, Regina Papais. Epidemiologia da esclerose lateral amiotrófica - Europa/América do Norte/América do Sul/Ásia: discrepâncias e similaridades: revisão sistemática da literatura. **Rev Bras Neurol**, vol. 45, no. 2, p. 5–10, 2009. .

FILADI, Riccardo; THEUREY, Pierre; PIZZO, Paola. The endoplasmic reticulum-mitochondria coupling in health and disease: Molecules, functions and significance. **Cell Calcium**, vol. 62, p. 1–15, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.01.003>.

FRIEDMAN, Jonathan R.; WEBSTER, Brant M.; MASTRONARDE, David N.; VERHEY, Kristen J.; VOELTZ, Gia K. ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. **Journal of Cell Biology**, vol. 190, no. 3, p. 363–375, 2010. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911024>.

GONZALEZ, Michael A.; FEELY, Shawna M.; SPEZIANI, Fiorella;

STRICKLAND, Alleene V.; DANZI, Matt; BACON, Chelsea; LEE, Youjin; CHOU, Tsui Fen; BLANTON, Susan H.; WEIHL, Conrad C.; ZUCHNER, Stephan; SHY, Michael E. A novel mutation in VCP causes Charcot-Marie-Tooth Type 2 disease. **Brain**, vol. 137, no. 11, p. 2897–2902, 2014. <https://doi.org/10.1093/brain/awu224>.

GRAD, Leslie I.; ROULEAU, Guy A.; RAVITS, John; CASHMAN, Neil R. Clinical Spectrum of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, vol. 7, no. 8, p. 1–15, 2017. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024117>.

GUO, Xuan; ZHAO, Zhe; SHEN, Hongrui; QI, Bing; LI, Nan; HU, Jing. VCP myopathy: A family with unusual clinical manifestations. **Muscle and Nerve**, vol. 59, no. 3, p. 365–369, 2019. <https://doi.org/10.1002/mus.26389>.

HALAWANI, Dalia; LATTERICH, Martin. p97: The Cell ' s Molecular Purgatory? Minireview. , p. 713–717, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.06.003>.

HALAWANI, Dalia; LEBLANC, Andréa C.; ROUILLER, Isabelle; MICHNICK, Stephen W.; SERVANT, Marc J.; LATTERICH, Martin. Hereditary Inclusion Body Myopathy-Linked p97/VCP Mutations in the NH2 Domain and the D1 Ring Modulate p97/VCP ATPase Activity and D2 Ring Conformation. **Molecular and Cellular Biology**, vol. 29, no. 16, p. 4484–4494, 2009. <https://doi.org/10.1128/mcb.00252-09>.

HALLIDAY, Glenda M; STEVENS, Claire H; HONS, Bmedsci; GLASS, Christopher K; SAIJO, Kaoru; WINNER, Beate; MARCHETTO, Maria Carolina; GAGE, Fred H. Review Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. **Cell**, vol. 140, no. 6, p. 918–934, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.016>.

HARDIMAN, Orla; VAN DEN BERG, Leonard H; KIERNAN, Matthew C. Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. **Nature reviews. Neurology**, vol. 7, no. 11, p. 639–49, Nov. 2011. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.153>.

HAVERKAMP, Lanny J.; APPEL, Vicki; APPEL, Stanley H. Natural history of

amyotrophic lateral sclerosis in a database population validation of a scoring system and a model for survival prediction. **Brain**, vol. 118, no. 3, p. 707–719, 1995. <https://doi.org/10.1093/brain/118.3.707>.

HUANG, Rui; RIPSTEIN, Zev A.; RUBINSTEIN, John L.; KAY, Lewis E. Probing Cooperativity of N-Terminal Domain Orientations in the p97 Molecular Machine: Synergy Between NMR Spectroscopy and Cryo-EM. **Angewandte Chemie - International Edition**, vol. 59, no. 50, p. 22423–22426, 2020. <https://doi.org/10.1002/anie.202009767>.

IKEDA, Masaki; KUWABARA, Takeo; TAKAI, Eriko; KASAHARA, Hiroo; FURUTA, Minori; SEKINE, Akiko; MAKIOKA, Kouki; YAMAZAKI, Tsuneo; FUJITA, Yukio; NAGASHIMA, Kazuaki; HIGUCHI, Tetsuya; TSUSHIMA, Yoshito; IKEDA, Yoshio. Increased Neurofilament Light Chain and YKL-40 CSF Levels in One Japanese IBMPFD Patient With VCP R155C Mutation: A Clinical Case Report With CSF Biomarker Analyses. **Frontiers in Neurology**, vol. 11, no. August, p. 1–8, 2020. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00757>.

ISHIKAWA, Hiroaki; YASUI, Kanako; OKETA, Yoshihiko; SUZUKI, Megumi; ONO, Seiitsu. Increased expression of valosin-containing protein in the skin of patients with amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of Clinical Neuroscience**, vol. 19, no. 4, p. 522–526, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2011.05.044>.

ITSARA, Leslie S.; KENNEDY, Scott R.; FOX, Edward J.; YU, Selina; HEWITT, Joshua J.; SANCHEZ-CONTRERAS, Monica; CARDOZO-PELAEZ, Fernando; PALLANCK, Leo J. Oxidative Stress Is Not a Major Contributor to Somatic Mitochondrial DNA Mutations. **PLoS Genetics**, vol. 10, no. 2, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003974>.

JERATH, Nivedita U; CROCKETT, Cameron D; MOORE, Steven A; SHY, Michael E; WEIHL, Conrad C; CHOU, Tsui-fen; GRIDER, Tiffany; GONZALEZ, Michael A; ZUCHNER, Stephan; SWENSON, Andrea. Case Report Rare Manifestation of a c . 290 C > T , p . Gly97Glu VCP Mutation. vol. 2015, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/239167>.

JOHNSON, Janel O.; MANDRIOLI, Jessica; BENATAR, Michael; ABRAMZON, Yevgeniya; VAN DEERLIN, Viviana M.; TROJANOWSKI, John Q.; GIBBS, J.

Raphael; BRUNETTI, Maura; GRONKA, Susan; WUU, Joanne; DING, Jinhui; MCCLUSKEY, Leo; MARTINEZ-LAGE, Maria; FALCONE, Dana; HERNANDEZ, Dena G.; AREPALLI, Sampath; CHONG, Sean; SCHYMICK, Jennifer C.; ROTHSTEIN, Jeffrey; ... TRAYNOR, Bryan J. Erratum exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. **Neuron**, vol. 69, no. 2, p. 397, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.01.009>.

JOHNSON, Janel O.; MANDRIOLI, Jessica; BENATAR, Michael; ABRAMZON, Yevgeniya; VAN DEERLIN, Vivianna M.; TROJANOWSKI, John Q.; GIBBS, J. Raphael; BRUNETTI, Maura; GRONKA, Susan; WUU, Joanne; DING, Jinhui; MCCLUSKEY, Leo; MARTINEZ-LAGE, Maria; FALCONE, Dana; HERNANDEZ, Dena G.; AREPALLI, Sampath; CHONG, Sean; SCHYMICK, Jennifer C.; ROTHSTEIN, Jeffrey; ... TRAYNOR, Bryan J. Exome Sequencing Reveals VCP Mutations as a Cause of Familial ALS. **Neuron**, vol. 68, no. 5, p. 857–864, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.036>.

KABEYA, Yukiko; MIZUSHIMA, Noboru; UENO, Takashi; YAMAMOTO, Akitsugu; KIRISAKO, Takayoshi; NODA, Takeshi; KOMINAMI, Eiki; OHSUMI, Yoshinori; YOSHIMORI, Tamotsu. LC3 , a mammalian homologue of yeast Apg8p , is localized in autophagosome membranes after processing. vol. 19, no. 21, 2000. .

KAKIZUKA, Akira. VCP, a Major ATPase in the Cells, as a Novel Drug Target for Currently Incurable Disorders. **Innovative Medicine**, , p. 61–69, 2015. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-55651-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-4-431-55651-0_5).

KIEFER, Florian; ARNOLD, Konstantin; KÜNZLI, Michael; BORDOLI, Lorenza; SCHWEDE, Torsten. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. **Nucleic acids research**, vol. 37, no. Database issue, p. D387-92, Jan. 2009. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn750>.

KIM, David E.; CHIVIAN, Dylan; BAKER, David. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. **Nucleic Acids Research**, vol. 32, p. 526–531, 2004. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh468>.

KIMONIS, Virginia E; FULCHIERO, Erin; VESA, Jouni; WATTS, Giles. Biochimica et Biophysica Acta VCP disease associated with myopathy , Paget



disease of bone and frontotemporal dementia: Review of a unique disorder. **BBA - Molecular Basis of Disease**, vol. 1782, no. 12, p. 744–748, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.09.003>.

KIRSHNER, H S. Frontotemporal dementia and primary progressive aphasia, a review. **Neuropsychiatric disease and treatment**, vol. 10, p. 1045–1055, 2014. DOI 10.2147/NDT.S38821. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24966676>.

KLUG, William S; CUMMINGS, Michael R; SPENCER, Charlotte A; PALADINO, Michael A. **Conceitos de Genética**. 9 edição. Porto Alegre: Editora ArtMed, 2010.

KOPPERS, Max; VAN BLITTERSWIJK, Marka M.; VLAM, Lotte; ROWICKA, Paulina A.; VAN VUGHT, Paul W.J.; GROEN, Ewout J.N.; SPLIET, Wim G.M.; ENGELEN-LEE, Joo Yeon; SCHELHAAS, Helenius J.; DE VISSER, Marianne; VAN DER KOOI, Anneke J.; VAN DER POL, W. Ludo; PASTERKAMP, R. Jeroen; VELDINK, Jan H.; VAN DEN BERG, Leonard H. VCP mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **Neurobiology of Aging**, vol. 33, no. 4, p. 837.e7-837.e13, 2012. DOI 10.1016/j.neurobiolaging.2011.10.006. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.10.006>.

KREBS, Bruna Baumgarten; DE MESQUITA, Joelma Freire. Amyotrophic Lateral Sclerosis Type 20 - In Silico Analysis and Molecular Dynamics Simulation of hnRNPA1. **PLoS ONE**, vol. 11, no. 7, p. e0158939, Jul. 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158939>.

KUMAR, Kishore R; NEEDHAM, Merrilee; MINA, Kym; DAVIS, Mark; BREWER, Janice; STAPLES, Christopher; NG, Karl; SUE, Carolyn M; MASTAGLIA, Frank L. Two Australian families with inclusion-body myopathy , Paget ' s disease of bone and frontotemporal dementia: Novel clinical and genetic findings. **Neuromuscular Disorders**, vol. 20, no. 5, p. 330–334, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.03.002>.

LASKOWSKI, R. a.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein

structures. **Journal of Applied Crystallography**, vol. 26, no. November, p. 283–291, 1 Apr. 1993. DOI 10.1107/S0021889892009944. Available at: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0021889892009944>. Accessed on: 9 May 2016.

LIZANO, Paulo; RASHED, Eman; KANG, Hobin; DAI, Huacheng; SUI, Xiangzhen; YAN, Lin; QIU, Hongyu; DEPRE, Christophe. The valosin-containing protein promotes cardiac survival through the inducible isoform of nitric oxide synthase. **Cardiovascular Research**, vol. 99, no. 4, p. 685–693, 2013. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt136>.

LIZANO, Paulo; RASHED, Eman; STOLL, Shaunrick; ZHOU, Ning; WEN, Hairuo; HAYS, Tristan T.; QIN, Gangjian; XIE, Lai Hua; DEPRE, Christophe; QIU, Hongyu. The valosin-containing protein is a novel mediator of mitochondrial respiration and cell survival in the heart in vivo. **Scientific Reports**, vol. 7, no. January 2016, p. 1–11, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep46324>.

LLEWELLYN, Katrina J; GOMEZ, Arianna; WALKER, Naomi; SU, Hailing; DUNNIGAN, Andrew; CHWA, Marilyn; VESA, Jouni; KENNEY, M C; KIMONIS, Virginia E; MEDICINE, Genomic. HHS Public Access. , p. 1–8, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2015.02.004>.In.

LOPEZ-CRISOSTO, Camila; PENNANEN, Christian; VASQUEZ-TRINCADO, Cesar; MORALES, Pablo E.; BRAVO-SAGUA, Roberto; QUEST, Andrew F. G.; CHIONG, Mario; LAVANDERO, Sergio. Sarcoplasmic reticulum–mitochondria communication in cardiovascular pathophysiology. **Nature Reviews Cardiology**, vol. 14, no. 6, p. 342–360, Jun. 2017. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.23>.

LYON, Miles; WOSISKI-KUHN, Marlana; GILLESPIE, Rachel; CARESS, James; MILLIGAN, Carol. Inflammation, Immunity and ALS: Etiology and Pathology. **Muscle & Nerve**, vol. jul, no. doi: 10.1002/mus.26289, 2018. DOI 10.1002/mus.26289. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/mus.26289>.

MANCUSO, Renzo; NAVARRO, Xavier. Amyotrophic lateral sclerosis: Current perspectives from basic research to the clinic. **Progress in Neurobiology**, vol.

133, p. 1–26, 2015. DOI 10.1016/j.pneurobio.2015.07.004. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.07.004>.

MARTINEZ, Carlos Augusto Real; CORDEIRO, Adriana Teixeira; PRIOLLI, Denise Gonçalves; MIRANDA, Daniel Duarte da Conceição; BARTCHEWSKY JÚNIOR, Waldemar; MARGARIDO, Nelson Fontana; RIBEIRO, Marcelo Lima. Evaluation of expression of mismatch repair gene MLH1 and levels of oxidative DNA damage in normal and neoplastic tissues of patients with colorectal cancer. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, vol. 29, no. 3, p. 303–313, 2009. <https://doi.org/10.1590/s0101-98802009000300004>.

MASRORI, P.; VAN DAMME, P. Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. **European Journal of Neurology**, vol. 27, no. 10, p. 1918–1929, 2020. <https://doi.org/10.1111/ene.14393>.

MATSUBARA, Shiro; SHIMIZU, Toshio; KOMORI, Takashi; MORI-YOSHIMURA, Madoka; MINAMI, Narihiro; HAYASHI, Yukiko K. Nuclear inclusions mimicking poly(A)-binding protein nuclear 1 inclusions in a case of inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia with a novel mutation in the valosin-containing protein gene. **Neuromuscular Disorders**, vol. 26, no. 7, p. 436–440, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2016.05.001>.

MEJZINI, Rita; FLYNN, Loren L.; PITOUT, Ianthe L.; FLETCHER, Sue; WILTON, Steve D.; AKKARI, P. Anthony. ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? **Frontiers in Neuroscience**, vol. 13, no. December, p. 1–27, 2019. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01310>.

MILLER, Robert G; MITCHELL, J D; MOORE, Dan H. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). **The Cochrane database of systematic reviews**, vol. 3, p. CD001447, Jan. 2012. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001447.pub3>.

MILLER, T D; JACKSON, A P; BARRESI, R; SMART, C M; EUGENICOS, M; SUMMERS, D; CLEGG, S; STRAUB, V; STONE, J. Inclusion body myopathy with Paget disease and frontotemporal dementia (IBMPFD): clinical features including sphincter disturbance in a large pedigree. **Journal of Neurology**,

**Neurosurgery and Psychiatry**, vol. 80, no. 5, p. 583–584, 2009. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2008.148676>.

MOREIRA, Lorena Giannini Alves. Modelagem estrutural e análises in silico das mutações da proteína VCP humana relacionadas à Esclerose Lateral Amiotrófica Lorena Giannini Alves Moreira. 2016. .

MOREIRA, Lorena Giannini Alves; PEREIRA, Livia Costa; DRUMMOND, Priscila Ramalho; DE MESQUITA, Joelma Freire. Structural and functional analysis of human SOD1 in amyotrophic lateral sclerosis. **PloS one**, vol. 8, no. 12, p. e81979, Jan. 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081979>.

MOUNTASSIF, Driss; FABRE, Lucien; ZAID, Younes; HALAWANI, Dalia; ROUILLER, Isabelle. Cryo-EM of the pathogenic VCP variant R155P reveals long-range conformational changes in the D2 ATPase ring. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 468, no. 4, p. 636–641, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.11.003>.

MOURA, Mirian Conceicao; CASULARI, Luiz Augusto; CARVALHO GARBI NOVAES, Maria Rita. Ethnic and demographic incidence of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in Brazil: A population based study. **Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration**, vol. 17, no. 3–4, p. 275–281, 2016. <https://doi.org/10.3109/21678421.2016.1140210>.

NEUMANN, Manuela; SAMPATHU, Deepak M.; KWONG, Linda K.; TRUAX, Adam C.; MICSENYI, Matthew C.; CHOU, Thomas T.; BRUCE, Jennifer; SCHUCK, Theresa; GROSSMAN, Murray; CLARK, Christopher M.; MCCLUSKEY, Leo F.; MILLER, Bruce L.; MASLIAH, Eliezer; MACKENZIE, Ian R.; FELDMAN, Howard; FEIDEN, Wolfgang; KRETZSCHMAR, Hans A.; TROJANOWSKI, John Q.; LEE, Virginia M.Y. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. **Science**, vol. 314, no. 5796, p. 130–133, 2006. <https://doi.org/10.1126/science.1134108>.

NEVES, Luiz Augusto Salles das. Herança Mendeliana e suas Variações. **Genética Vegetal**. 1st ed. Santa Maria: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA, 2021. p. 65–79.

NIWA, Hajime; EWENS, Caroline A.; TSANG, Chun; YEUNG, Heidi O.;

ZHANG, Xiaodong; FREEMONT, Paul S. The role of the N-domain in the atpase activity of the mammalian AAA ATPase p97/VCP. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 287, no. 11, p. 8561–8570, 2012.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.302778>.

OLIVEIRA, Clara Carolina Silva De; PEREIRA, Gabriel Rodrigues Coutinho; ALCANTARA, Jamile Yvis Santos De; ANTUNES, Deborah; CAFFARENA, Ernesto Raul; MESQUITA, Joelma Freire De. In silico analysis of the V66M variant of human BDNF in psychiatric disorders: An approach to precision medicine. **PLoS ONE**, vol. 14, no. 4, p. e0215508, 2019. .

ONYIKE, Chiadi U.; DIEHL-SCHMID, Janine. The Epidemiology of Frontotemporal Dementia. **Int Rev Psychiatry**, vol. 25, no. 2, p. 130–137, 2013. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.167>.Gene.

PADHI, Aditya K.; BANERJEE, Kamalika; GOMES, James; BANERJEE, Manidipa. Computational and functional characterization of angiogenin mutations, and correlation with amyotrophic lateral sclerosis. **PLoS ONE**, vol. 9, no. 11, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111963>.

PAILLUSSON, Sebastien; STOICA, Radu; GOMEZ-SUAGA, Patricia; LAU, Dawn H.W.; MUELLER, Sarah; MILLER, Tanya; MILLER, Christopher C.J. There's Something Wrong with my MAM; the ER-Mitochondria Axis and Neurodegenerative Diseases. **Trends in Neurosciences**, vol. 39, no. 3, p. 146–157, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.01.008>.

PALMA, Romero. Flávio Romero Palma. **Universidade de São Paulo**, vol. Tese de Do, no. São Paulo, p. 1–50, 2016. .

PEJAVER, Vikas; URRESTI, Jorge; LUGO-MARTINEZ, Jose; PAGEL, Kymberleigh A.; LIN, Guan Ning; NAM, Hyun-Jun; MORT, Matthew; COOPER, David N.; SEBAT, Jonathan; IAKOUCHEVA, Lilia M.; MOONEY, Sean D.; RADIVOJAC, Predrag. MutPred2: inferring the molecular and phenotypic impact of amino acid variants. **bioRxiv**, , p. 134981, 2017. DOI 10.1101/134981. Available at:

<https://www.biorxiv.org/content/early/2017/05/09/134981>.

PEREIRA, G. R.C.; DA SILVA, A. N.R.; DO NASCIMENTO, S. S.; DE

MESQUITA, J. F. In silico analysis and molecular dynamics simulation of human superoxide dismutase 3 (SOD3) genetic variants. **Journal of Cellular Biochemistry**, vol. 120, no. 3, p. 3583–3598, 2019.

<https://doi.org/10.1002/jcb.27636>.

PEREIRA, Gabriel Rodrigues Coutinho; DE AZEVEDO ABRAHIM VIEIRA, Bárbara; DE MESQUITA, Joelma Freire. Comprehensive in silico analysis and molecular dynamics of the superoxide dismutase 1 (SOD1) variants related to amyotrophic lateral sclerosis. **PLoS ONE**, vol. 16, no. 2 February, p. 1–27, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247841>.

PEREIRA, Roberto Dias Batista. Epidemiologia: ELA no Mundo Epidemiology: ALS in World Regiões. **Revista de Neurociências**, vol. v. 14, n., p. 9–13, 2006.

.

PERRONE, Benedetta; CONFORTI, Francesca Luisa. Common mutations of interest for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: how common are common mutations in ALS genes? **Expert Review of Molecular Diagnostics**, vol. 0, no. 0, 2020. <https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1779060>.

PIGUET, Olivier; HORNBERGER, Michael; MIOSHI, Eneida; HODGES, John R. Behavioural-variant frontotemporal dementia: Diagnosis, clinical staging, and management. **The Lancet Neurology**, vol. 10, no. 2, p. 162–172, 2011. DOI 10.1016/S1474-4422(10)70299-4. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70299-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70299-4).

RABOUILLE, Catherine; LEVINE, Timothy P; PETERS, Jan-michael; WARREN, Graham. An NSF-like ATPase , p97 , and NSF Mediate Cisternal Regrowth from Mitotic Golgi Fragments. vol. 82, p. 905–914, 1995. .

RAMESH, Nandini; PANDEY, Udai Bhan. Autophagy Dysregulation in ALS: When Protein Aggregates Get Out of Hand. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, vol. 10, no. August, p. 1–18, 2017. DOI 10.3389/fnmol.2017.00263. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2017.00263/full>.

RAMOS-CAMPOY, Oscar; ANTONELL, Anna; FALGÀS, Neus; BALASA, Mircea; BORREGO-ÉCIJA, Sergi; RODRÍGUEZ-SANTIAGO, Benjamín;

DATTA, Debayan; ARMENGOL, Lluís; FERNÁNDEZ-VILLULLAS, Guadalupe; BOSCH, Beatriz; OLIVES, Jaume; MUÑOZ-GARCÍA, Cristina; CASTELLVÍ, Magdalena; TORT-MERINO, Adrià; SÁNCHEZ-VALLE, Raquel; LLADÓ, Albert. Screening of dementia genes by whole-exome sequencing in Spanish patients with early-onset dementia: likely pathogenic, uncertain significance and risk variants. **Neurobiology of Aging**, vol. 93, p. e1–e9, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2020.02.008>.

REDLER, Rachel L.; DOKHOLYAN, Nikolay V. **The complex molecular biology of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)**. 1st ed. [S. l.]: Elsevier Inc., 2012. vol. 107, . <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385883-2.00002-3>.

RELINI, Annalisa; CAVALLERI, Ornella; ROLANDI, Ranieri; GLIOZZI, Alessandra. The two-fold aspect of the interplay of amyloidogenic proteins with lipid membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, vol. 158, no. 1, p. 1–9, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2008.11.003>.

RENTON, Alan E; CHIÒ, Adriano; TRAYNOR, Bryan J. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics HHS Public Access Author manuscript. **Nat Neurosci**, vol. 17, no. 1, p. 17–23, 2014. <https://doi.org/10.1038/nn.3584.State>.

RIJAL, Ramesh; ARHZAOUY, Khalid; STRUCKSBERG, Karl Heinz; CROSS, Megan; HOFMANN, Andreas; SCHRÖDER, Rolf; CLEMEN, Christoph S.; EICHINGER, Ludwig. Mutant p97 exhibits species-specific changes of its ATPase activity and compromises the UBXD9-mediated monomerisation of p97 hexamers. **European Journal of Cell Biology**, vol. 95, no. 6–7, p. 195–207, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2016.03.004>.

ROBBERECHT, Wim; PHILIPS, Thomas. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. **Nature reviews. Neuroscience**, vol. 14, no. 4, p. 248–64, Apr. 2013. <https://doi.org/10.1038/nrn3430>.

ROSE, Peter W.; PRLIĆ, Andreas; ALTUNKAYA, Ali; BI, Chunxiao; BRADLEY, Anthony R.; CHRISTIE, Cole H.; DI COSTANZO, Luigi; DUARTE, Jose M.; DUTTA, Shuchismita; FENG, Zukang; GREEN, Rachel Kramer; GOODSSELL, David S.; HUDSON, Brian; KALRO, Tara; LOWE, Robert; PEISACH, Ezra;

RANDLE, Christopher; ROSE, Alexander S.; SHAO, Chenghua; ... BURLEY, Stephen K. The RCSB protein data bank: Integrative view of protein, gene and 3D structural information. **Nucleic Acids Research**, vol. 45, no. Database, p. D271–D281, 2017. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1000>.

ROTHSTEIN, Jeffrey D. Edaravone: A new drug approved for ALS. **Cell**, vol. 171, no. 4, p. 725, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.011>.

RUFFALO, Matthew; BAR-JOSEPH, Ziv. Protein interaction disruption in cancer. **BMC Cancer**, vol. 19, no. 1, p. 1–10, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5532-5>.

RYAN, Kerry C.; ASHKAVAND, Zahra; NORMAN, Kenneth R. The role of mitochondrial calcium homeostasis in alzheimer's and related diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 21, no. 23, p. 1–17, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21239153>.

S. SPINA ET AL. Phenotypic variability in three families with valosin-containing protein mutation. **Bone**, vol. 23, no. 1, p. 1–7, 2013. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.

SAWADA, Hideyuki. Clinical efficacy of edaravone for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, vol. 18, no. 7, p. 735–738, 2017. DOI 10.1080/14656566.2017.1319937. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/14656566.2017.1319937>.

SCHÜTZ, Anne Kathrin; RENNELLA, Enrico; KAY, Lewis E. Exploiting conformational plasticity in the AAA+ protein VCP/p97 to modify function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 114, no. 33, p. E6822–E6829, 2017. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707974114>.

SCHYMKOWITZ, Joost W H; ROUSSEAU, Frederic; MARTINS, Ivo C; FERKINGHOFF-BORG, Jesper; STRICHER, Francois; SERRANO, Luis. Prediction of water and metal binding sites and their affinities by using the Fold-X force field. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 102, no. 29, p. 10147–10152, 2005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501980102>.



SIPPL, Manfred J. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, vol. 17, no. 4, p. 355–362, 1993. <https://doi.org/10.1002/prot.340170404>.

SIRANGELO, Ivana; VELLA, Filomena M.; IRACE, Gaetano; MANCO, Giuseppe; IANNUZZI, Clara. Glycation in demetalated superoxide dismutase 1 prevents amyloid aggregation and produces cytotoxic ages adducts. **Frontiers in Molecular Biosciences**, vol. 3, no. SEP, p. 1–12, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00055>.

SOLAYMAN, Md; SALEH, Md Abu; PAUL, Sudip; KHALIL, Md Ibrahim; GAN, Siew Hua. In silico analysis of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms of the human adiponectin receptor 2 (ADIPOR2) gene. **Computational Biology and Chemistry**, vol. 68, p. 175–185, 2017. DOI 10.1016/j.compbiolchem.2017.03.005. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2017.03.005>.

SONG, Yifan; DIMAIO, Frank; WANG, Ray Yu Ruei; KIM, David; MILES, Chris; BRUNETTE, Tj; THOMPSON, James; BAKER, David. High-resolution comparative modeling with RosettaCM. **Structure**, vol. 21, no. 10, p. 1735–1742, Oct. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.08.005>.

SORRENTINO, Vincenzo; MENZIES, Keir J.; AUWERX, Johan. Repairing Mitochondrial Dysfunction in Disease. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, vol. 58, no. September, p. 353–389, 2018. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104908>.

STUDIES, Clinical. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis. **Drug and Therapeutics Bulletin**, vol. 35, no. 2, p. 11–12, 1997. <https://doi.org/10.1136/dtb.1997.35211>.

SUN, Xiaonan; QIU, Hongyu. Valosin-Containing Protein, a Calcium-Associated ATPase Protein, in Endoplasmic Reticulum and Mitochondrial Function and Its Implications for Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 21, no. 11, p. 3842, May 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21113842>.

SURAMPALLI ET AL., 2015. A case report comparing clinical, imaging and neuropsychological assessment findings in twins discordant for the VCP

p.R155C mutation. **Physiology & behavior**, vol. 176, no. 1, p. 139–148, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2014.10.003.A>.

TANAKA, Keiji; MATSUDA, Noriyuki. Proteostasis and neurodegeneration: The roles of proteasomal degradation and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, vol. 1843, no. 1, p. 197–204, 2014. DOI 10.1016/j.bbamcr.2013.03.012. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.03.012>.

TANIDA, Isei; UENO, Takashi; KOMINAMI, Eiki. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . no. January, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.05.009>.

TERASAKI, M.; CHEN, L. B.; FUJIWARA, K. Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. **Journal of Cell Biology**, vol. 103, no. 4, p. 1557–1568, 1986. <https://doi.org/10.1083/jcb.103.4.1557>.

TERRENCE SANVICTORES & DONALD D. DAVIS. Histochemistry and Cytochemistry Microscopy Light Pathophysiology Clinical Significance Continuing Education / Review Questions. 2020. .

THOUDAM, Themis; JEON, Jae Han; HA, Chae Myeong; LEE, In Kyu. Role of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane in inflammation-mediated metabolic diseases. **Mediators of Inflammation**, vol. 2016, p. 10–13, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1851420>.

TIRYAKI, Ezgi; HORAK, Holli A. ALS and other motor neuron diseases. **CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology**, vol. 20, no. 5, p. 1185–1207, 2014. <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000455886.14298.a4>.

VAN ES, Michael A.; HARDIMAN, Orla; CHIO, Adriano; AL-CHALABI, Ammar; PASTERKAMP, R. Jeroen; VELDINK, Jan H.; VAN DEN BERG, Leonard H. Amyotrophic lateral sclerosis. **The Lancet**, vol. 390, no. 10107, p. 2084–2098, 2017. DOI 10.1016/S0140-6736(17)31287-4. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31287-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31287-4).

VASER, Robert; ADUSUMALLI, Swarnaseetha; LENG, Sim Ngak; SIKIC, Mile;

NG, Pauline C. SIFT missense predictions for genomes. **Nature Protocols**, vol. 4, no. December 2015, p. 1073–1081, Jan. 2015. DOI 10.1038/nprot.2015.123. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2015.123>.

VERLI, Hugo. **Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular**. São Paulo, Brasil: [s. n.], 2014. vol. 1, . <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.

WATTS, G. D.G.; THOMASOVA, D.; RAMDEEN, S. K.; FULCHIERO, E. C.; MEHTA, S. G.; DRACHMAN, D. A.; WEIHL, C. C.; JAMROZIK, Z.; KWIECINSKI, H.; KAMINSKA, A.; KIMONIS, Virginia E. Novel VCP mutations in inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia. **Clinical Genetics**, vol. 72, no. 5, p. 420–426, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00887.x>.

WATTS, Giles D J; WYMER, Jill; KOVACH, Margaret J; MEHTA, Sarju G; MUMM, Steven; DARVISH, Daniel; PESTRONK, Alan; WHYTE, Michael P; KIMONIS, Virginia E. Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. vol. 36, no. 4, p. 377–381, 2004. <https://doi.org/10.1038/ng1332>.

WAUTERS, Eline; SLEEGERS, Kristel; CRUTS, Marc; BROECKHOVEN, Christine Van. Chapter 8 - Frontotemporal dementia. **Disease-Modifying Targets in Neurodegenerative Disorders**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2017. p. 199–249. DOI 10.1016/B978-0-12-805120-7/00009-9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-805120-7/00009-9>.

WEIDS, Alan J.; IBSTEDT, Sebastian; TAMÁS, Markus J.; GRANT, Chris M. Distinct stress conditions result in aggregation of proteins with similar properties. **Scientific Reports**, vol. 6, no. February, p. 1–12, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep24554>.

WELIHINDA, Ajith A.; TIRASOPHON, Witoon; KAUFMAN, Randal J. The cellular response to protein misfolding in the endoplasmic reticulum. **Gene Expression**, vol. 7, no. 4–6, p. 293–300, 1999. .

WEN, Bo; LAMPE, Jed N; ROBERTS, Arthur G; ATKINS, William M; RODRIGUES, A David; NELSON, Sidney D. VCP/p97 is essential for

maturation of ubiquitin-containing autophagosomes and this function is impaired by mutations that cause IBMPFD. **Autophagy**, vol. 454, no. 1, p. 42–54, 2010. .

WHEELER, D L; CHAPPEY, C; LASH, a E; LEIPE, D D; MADDEN, T L; SCHULER, G D; TATUSOVA, T a; RAPP, B a. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic acids research**, vol. 28, no. 1, p. 10–4, 2000. DOI gkd055 [pii] ET - 1999/12/11. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=102437&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

WIEDERSTEIN, Markus; SIPPL, Manfred J. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, vol. 35, no. SUPPL.2, p. 407–410, 2007. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm290>.

WILKINSON, Simon. ER-phagy: shaping up and destressing the endoplasmic reticulum. **FEBS Journal**, vol. 286, no. 14, p. 2645–2663, 2019. <https://doi.org/10.1111/febs.14932>.

WILLIAMS, Christopher J.; HEADD, Jeffrey J.; MORIARTY, Nigel W.; PRISANT, Michael G.; VIDEAU, Lizbeth L.; DEIS, Lindsay N.; VERMA, Vishal; KEEDY, Daniel A.; HINTZE, Bradley J.; CHEN, Vincent B.; JAIN, Swati; LEWIS, Steven M.; ARENDALL, W. Bryan; SNOEYINK, Jack; ADAMS, Paul D.; LOVELL, Simon C.; RICHARDSON, Jane S.; RICHARDSON, David C. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. **Protein Science**, 2018. <https://doi.org/10.1002/pro.3330>.

XIONG, Jin. **Essential Bioinformatics**. [S. l.: s. n.], 2006. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.

XU, Lu; LIU, Tanxin; LIU, Lili; YAO, Xiaoying; CHEN, Lu; FAN, Dongsheng; ZHAN, Siyan; WANG, Shengfeng. Global variation in prevalence and incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Neurology**, vol. 267, no. 4, p. 944–953, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09652-y>.

YAMAMOTO, Shinji; TOMITA, Yasuhiko; HOSHIDA, Yoshihiko; IIZUKA, Norishige; MONDEN, Morito; YAMAMOTO, Satoru; IUCHI, Keiji; AOZASA,

Katsuyuki. Expression level of valosin-containing protein (p97) is correlated with progression and prognosis of non-small-cell lung carcinoma. **Annals of Surgical Oncology**, vol. 11, no. 7, p. 697–704, 2004. <https://doi.org/10.1245/ASO.2004.10.018>.

YAMAMOTO, Shinji; TOMITA, Yasuhiko; URUNO, Takashi; HOSHIDA, Yoshihiko; QIU, Ying; IIZUKA, Norishige; NAKAMICHI, Itsuko; MIYAUCHI, Akira; AOZASA, Katsuyuki. Increased expression of valosin-containing protein (p97) is correlated with disease recurrence in follicular thyroid cancer. **Annals of Surgical Oncology**, vol. 12, no. 11, p. 925–934, 2005. <https://doi.org/10.1245/ASO.2005.07.002>.

YAMANAKA, Kunitoshi; SASAGAWA, Yohei; OGURA, Teru. Recent advances in p97/VCP/Cdc48 cellular functions. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, vol. 1823, no. 1, p. 130–137, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.07.001>.

YAMASHITA, Satoshi; ANDO, Yukio. Genotype-phenotype relationship in hereditary amyotrophic lateral sclerosis. **Translational Neurodegeneration**, vol. 4, no. 1, 2015. <https://doi.org/10.1186/s40035-015-0036-y>.

YANG, Jianyi; ZHANG, Yang. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. **Nucleic acids research**, vol. 43, no. W1, p. W174-181, 2015. DOI 10.1093/nar/gkv342. Available at: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/long/43/W1/W174>.

YAO, Ren Qi; REN, Chao; XIA, Zhao Fan; YAO, Yong Ming. Organelle-specific autophagy in inflammatory diseases: a potential therapeutic target underlying the quality control of multiple organelles. **Autophagy**, vol. 8627, 2020. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1725377>.

YE, Yihong; MEYER, Hemmo H; RAPOPORT, Tom A. retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. vol. 162, no. 1, p. 71–84, 2003. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302169>.

YEHUDA, Adi Ben; RISHEQ, Marwa; NOVOPLANSKY, Ofra; BERSUKER, Kirill; KOPITO, Ron R.; GOLDBERG, Michal; BRANDEIS, Michael. Ubiquitin

accumulation on disease associated protein aggregates is correlated with nuclear ubiquitin depletion, histone De-ubiquitination and impaired DNA damage response. **PLoS ONE**, vol. 12, no. 1, p. 1–17, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169054>.

ZHANG, Kezhong; KAUFMAN, Randal J. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. **Nature**, vol. 454, no. 7203, p. 455–462, 2008. <https://doi.org/10.1038/nature07203>.

ZHANG, Xiaoyi; GUI, Lin; ZHANG, Xiaoyan; BULFER, Stacie L.; SANGHEZ, Valentina; WONG, Daniel E.; LEE, You Jin; LEHMANN, Lynn; LEE, James Siho; SHIH, Pei Yin; LIN, Henry J.; IACOVINO, Michelina; WEIHL, Conrad C.; ARKIN, Michelle R.; WANG, Yanzhuang; CHOU, Tsui Fen. Altered cofactor regulation with disease-associated p97/VCP mutations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 112, no. 14, p. E1705–E1714, 2015. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418820112>.

ZHANG, Yang; SKOLNICK, Jeffrey. TM-align: A protein structure alignment algorithm based on the TM-score. **Nucleic Acids Research**, vol. 33, no. 7, p. 2302–2309, 2005. <https://doi.org/10.1093/nar/gki524>.

ZHOU, Ning; MA, Ben; STOLL, Shaunrick; HAYS, Tristan T.; QIU, Hongyu. The valosin-containing protein is a novel repressor of cardiomyocyte hypertrophy induced by pressure overload. **Aging Cell**, vol. 16, no. 5, p. 1168–1179, 2017. <https://doi.org/10.1111/acer.12653>.

ZHOU, Ning; STOLL, Shaunrick; QIU, Hongyu. VCP represses pathological cardiac hypertrophy. vol. 9, no. 12, p. 2469–2470, 2017.