



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Ciências Médicas

Helen Maia Tavares de Andrade

Genética e Esclerose Lateral Amiotrófica: estudo de
microRNAS e do Gene *ATXN2*

Genetics and Amyotrophic Lateral Sclerosis: study of
microRNAS and *ATXN2* Gene

Campinas
2018

Helen Maia Tavares de Andrade

**Genética e Esclerose Lateral Amiotrófica: estudo de
microRNAs e do Gene ATXN2**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de
Doutora em Ciências, na Área de Neurologia

*Doctorate thesis presented to the School of Medical Sciences of the
University of Campinas to obtain the Ph.D. grade in Sciences*

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCONDES CAVALCANTE FRANÇA JUNIOR

COORIENTADOR: DRA. DANYELLA BARBOSA DOGNI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA HELEN MAIA TAVARES DE ANDRADE E
ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCONDES
CAVALCANTE FRANÇA JUNIOR

CAMPINAS
2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 470428/2011-2

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

An24g Andrade, Helen Maia Tavares de, 1979-
Genética e esclerose lateral amiotrófica : estudo de microRNAs e do gene da *ATXN2* / Helen Maia Tavares de Andrade. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

○ Orientador: Marcondes Cavalcante França Junior.

○ Coorientador: Danyella Barbosa Dogini.

○ Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

○ 1. Esclerose lateral amiotrófica. 2. microRNAs. 3. Ataxina-2. 4. Doença dos neurônios motores - Brasil. I. França Junior, Marcondes Cavalcante, 1976-. II. Dogini, Danyella Barbosa. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Genetics and amyotrophic lateral sclerosis : study of microRNAs and *ATXN2* gene

Palavras-chave em inglês:

Amyotrophic Lateral Sclerosis

microRNAs

Ataxin-2

Motor neuron disease, Brazil

Área de concentração: Neurologia

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Marcondes Cavalcante França Junior [Orientador]

Helga Cristina Almeida da Silva

Cláudia Vianna Maurer Morelli

Edmar Zanoteli

Fábio Rogério

Data de defesa: 30-05-2018

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Banca Examinadora de Defesa de Doutorado Helen Maia Tavares de Andrade

Orientador: Marcondes Cavalcante França Junior
Coorientadora: Danyella Barbosa Dogni

Membros:

1. Prof. Dr. Marcondes Cavalcante França Junior
2. Prof.^a Dr.^a Helga Cristina Almeida da Silva
3. Prof.^a Dr.^a Cláudia Vianna Maurer Morelli
4. Prof. Dr. Edmar Zanoteli
5. Prof. Dr. Fábio Rogério

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 30 de maio de 2018

Dedico este trabalho ao meu marido Andrés, companheiro incansável há 20 anos.

Agradecimentos

A realização de um trabalho de pesquisa só é possível com a colaboração e dedicação de várias pessoas. Neste trabalho tive a sorte de encontrar várias dispostas a colaborar e principalmente a me ensinar. Por isso, segue meu agradecimento a todas elas.

Ao meu orientador Marcondes pelo confiança, pelo aprendizado e apoio em horas muito difíceis que ocorreram no caminho.

À toda equipe do Laboratório de Genética pelo carinho que me receberam e pela paciência em me ensinar técnicas de laboratório, a Danyella Dogni, minha coorientadora, por me orientar nas primeiras pipetagens, a Simoni Avansini pela imensa paciência e bom humor por meses me orientando quanto as técnicas de microRNA, a Luciana Bonadia pela enorme colaboração no estudo do gene *ATXN2*, a Marilza e a Luciana pela coleta de sangue.

À amiga e companheira de doutorado Milena Albuquerque que desde do início trabalhou muito comigo coletando pacientes e aplicando escalas clínicas.

À equipe do Ambulatório de Neurologia que facilitou e ajudou em nossa coleta de dados.

Aos pacientes que apesar de toda limitação física se esforçaram em participar da pesquisa no intuito de ajudar a ciência e futuros pacientes.

Aos meus pais que muito se esforçaram para me oferecer formação e pelo exemplo de caráter, trabalho e determinação que me deram.

Aos meus irmãos Emerson e Henrique pelo apoio de toda a vida.

Ao meu querido marido Andrés que apoia minha formação desde e faculdade, por nunca ter reclamado de minhas ausências e por nunca ter me deixado desistir.

A minha linda filha Catarina que enche minha vida de cor e força para seguir adiante.

À minha amiga e fiel funcionária Lucia, que cuida do meu lar com muito carinho, permitindo que eu trabalhe e estude com tranquilidade.

RESUMO

Introdução: A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa caracterizada por acometimento do primeiro e do segundo neurônio motor que resulta em paralisia progressiva e morte. Não há teste diagnóstico para a ELA e há pouca informação sobre as características genéticas da mesma no Brasil. **Objetivos:** o objetivo do primeiro estudo foi avaliar os miRNAs como ferramenta diagnóstica e prognóstica, enquanto que o objetivo do segundo foi analisar se as expansões repetidas de CAG de tamanho intermediário no gene *ATXN2* aumentam o risco para desenvolver ELA no Brasil como ocorre em outras populações. **Métodos:** O perfil de expressão dos miRNAs no músculo foi avaliado usando uma plataforma *array* e em seguida avaliamos a expressão plasmática de miRNAs candidatos em um conjunto de 39 pacientes provenientes do ambulatório da Unicamp e 39 controles. Empregamos *generalized estimating equations* para investigar as correlações com os dados clínicos. No estudo do gene *ATXN2*, selecionamos 459 pacientes com ELA (372 ELA esporádica – ELAs e 87 ELA familiar – ELAf) e 468 controles de seis centros brasileiros. Foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR) para determinar o comprimento dos alelos *ATXN2*. Os produtos de PCR foram resolvidos usando eletroforese capilar no sequenciador capilar ABI 3500 xl. **Resultados:** Identificamos 11 miRNAs diferencialmente expressos no músculo de pacientes com ELA; destes, os miR-424, miR-214 e miR-206 foram validados por qPCR em tecido muscular. No plasma, encontramos somente os miR-424 e miR-206 hiperexpressos. A expressão basal do miR-424 e do miR-206 correlacionou-se negativamente com a deterioração clínica dos pacientes ao longo do tempo. O segundo estudo, mostrou que as expansões de poliglutamina de comprimento intermediário *ATXN2* maiores que 26 repetições foram associadas a um risco aumentado de desenvolver ELA (odds ratio = 2.56, 95%CI: 1.29 – 5.08, p=0.005). **Conclusões:** miR-424 e o miR-206 são potenciais marcadores diagnósticos e prognósticos para ELA e que as expansões de repetição CAG de comprimento intermediário no gene *ATXN2* desempenham um papel importante na patogênese da ELA também na população brasileira.

ABSTRACT

Introduction: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by upper and lower motor neuron damage resulting in progressive paralysis and death. There is no definite diagnostic test for the disease and little is known about the genetic profile of ALS in Brazil as it occurs in other populations.

Objectives: We performed two studies and the objective of the first study was to evaluate miRNAs as a diagnostic and prognostic tool in the disease, whereas the objective of the second study was to evaluate if intermediate-length CAG repeat expansions in the *ATXN2* gene increased the risk for ALS in Brazil.

Methods: Expression profile of miRNAs in muscle was evaluated using an array platform. Subsequently we assessed the plasmatic expression of candidate miRNAs in a set of 39 patients/39 controls from Neuromuscular Outpatient Clinic at UNICAMP hospital. We employed generalized estimating equations to investigate correlations with clinical data. In the study of the *ATXN2* gene, we selected 459 patients with ALS (372 sporadic ALS and 87 familiar ALS) and 468 control subjects from six Brazilian centers. Polymerase chain reaction (PCR) was performed to determine the length of the *ATXN2* alleles. PCR products were resolved using capillary electrophoresis on ABI 3500 xl capillary sequencer.

Results: We identified 11 miRNAs differentially expressed in the muscle of ALS patients; of these, miR-424, miR-214 and miR-206 were validated by qPCR in muscle samples. In plasma, we found only miR-424 and miR-206 to be overexpressed. Baseline expression of miR-424 and miR-206 correlated negatively with clinical deterioration over time. In the second study, we found that *ATXN2* intermediate-length polyglutamine expansions larger than 26 repeats were associated with an increased risk for ALS (odds ratio = 2.56, 95%CI: 1.29 – 5.08, p=0.005).

Conclusions: miR-424 and miR-206 are potential prognostic markers for ALS and that intermediate-length CAG repeat expansions in *ATXN2* play an important role in the pathogenesis of ALS also in the Brazilian population.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Biogênese e modo de ação dos miRNAs.....	30
Figura 2 - Mecanismos de liberação celular e sistemas extracelulares de transporte de microRNAs.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes e loci ligados à Esclerose Lateral Amiotrófica familiar (ELAf).....	17
Tabela 2 - Critério El Escorial.....	22
Tabela 3 - Critério El Escorial- revisado	23
Tabela 4 - Critérios de Awaji-shima.....	25
Tabela 5 - Diagnóstico Diferencial em ELA.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP: atrofia muscular progressiva

DFT: Demência Frontotemporal

DNM: doença do neurônio motor

ELA: esclerose lateral amiotrófica

ELP: esclerose lateral primária

ELAs: esclerose lateral amiotrófica esporádica

ELAf: esclerose lateral amiotrófica familiar

ENMG: Eletroneuromiografia

RNAm: RNA mensageiro

3'UTR: região 3' não traduzida

5'UTR: região 5' não traduzida

HDL: lipoproteínas de alta densidade

LCR: Líquido CefaloRaquiano

miRNAs: MicroRNAs

MMII: membros inferiores

MMSS: membros superiores

NMI: neurônio motor inferior

NMS: neurônio motor superior

NMMBC: Neuropatia Motora Multifocal com Bloqueio de condução

PEV: Potencial Evocado Visual

RM: Ressonância Magnética;

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	14
1.1 - ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA.....	14
1.1.1 - <i>Formas Clínicas</i>	14
1.1.2 - <i>Genética</i>	16
1.1.3 - <i>Diagnóstico</i>	22
1.1.4 - <i>Biomarcador</i>	28
1.1.5 - <i>MicroRNAs</i>	29
1.1.6 - <i>Justificativa</i>	32
2 - OBJETIVOS	34
2.1 - OBJETIVOS GERAIS.....	34
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
OBJETIVOS RELACIONADOS AO TRABALHO APRESENTADO NO CAPÍTULO 1 (MIRNAS)	34
OBJETIVOS RELACIONADOS AO TRABALHO APRESENTADO NO CAPÍTULO 2 (GENE <i>ATXN2</i>)	34
3 - METODOLOGIA	35
3.1 - CAPÍTULO 1 – METODOLOGIA DO ARTIGO DE MIRNAS	35
3.1.1 - <i>Desenho do Estudo</i>	35
3.1.2 - <i>Seleção de Sujeitos</i>	35
3.1.3 - <i>Análise de expressão em amostras de músculo esquelético</i>	36
3.1.4 - <i>Análise de expressão em plasma</i>	37
3.1.5 - <i>Avaliação clínica</i>	37
3.1.6 - <i>Isolamento de RNA</i>	37
3.1.7 - <i>Análise genética do Chip miRNAarray</i>	38
3.1.8 - <i>Transcrição reversa e PCR quantitativa em tempo real</i>	38
3.1.9 - <i>Previsões computacionais para alvos de miRNAs humanos</i>	39
3.1.10 - <i>Análise Estatística</i>	39
3.2 - CAPÍTULO 2 – METODOLOGIA DO ARTIGO DO GENE <i>ATXN2</i>	40

3.2.1 - Seleção dos Sujeitos.....	40
3.2.2 - Estudo Molecular.....	40
3.2.3 - Análise Estatística.....	41
4 - RESULTADOS.....	42
CAPÍTULO 1 – ARTIGO DE MIRNAS (133).....	42
CAPÍTULO 2 – ARTIGO DO GENE <i>ATXN2</i>	49
5 - DISCUSSÃO GERAL.....	54
6 - CONCLUSÃO.....	58
7 - REFERÊNCIAS.....	59
8 - ANEXOS.....	72

1 - Introdução

1.1 - Esclerose Lateral Amiotrófica

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma desordem neuromuscular rara caracterizada por progressiva degeneração do tronco encefálico, trato corticospinal e ponta anterior da medula (1). A forma clássica desta doença devastadora apresenta sinais simultâneos de dano ao primeiro e segundo neurônio motor, que progridem e resultam em paralisia e morte por insuficiência respiratória em dois a três anos em média (2).

A incidência é de aproximadamente 2 por 100.000 pessoas/ano e a prevalência é de cerca de 5 por 100.000 pessoas (3). Existe um atraso significativo no diagnóstico, com média de um ano, independentemente do sistema de saúde avaliado, provavelmente relacionado ao baixo reconhecimento pelos médicos da atenção primária e por neurologistas gerais (4). A idade é o fator de risco mais importante, com um aumento da mortalidade relacionado à idade até a oitava década e taxa de mortalidade máxima entre 65 e 75 anos (5). O sexo masculino também é um fator de risco, com uma relação masculino: feminino 3:2, mas esta diferença de sexo não é válida para todas as populações, e pode depender da estrutura etária do grupo estudado, já que os homens predominam nos grupos de pacientes mais jovens (6).

1.1.1 - Formas Clínicas

A apresentação clínica pode variar - a forma clássica apresenta sintomas de neurônio motor superior (NMS) como fraqueza, espasticidade, diminuição da destreza, reflexos patológicos, hiperreflexia, sinais pseudobulbares e reflexos mantidos em membros atróficos associados a sintomas de neurônio motor inferior (NMI) como fraqueza, atrofia, fasciculações, câibras e hiporreflexia (5). A forma de apresentação inicial pode ser classificada de acordo com a região corporal em ELA de início espinal (70% dos casos) e ELA de início bulbar (25% dos casos) (7). Formas atípicas de apresentação incluem perda de peso, câibras e fasciculações na ausência de fraqueza, e formas com labilidade emocional e disfunção cognitiva do tipo frontal (8). Outros sintomas frequentemente observados nos estágios iniciais são fadiga e diminuição na capacidade de realizar exercícios (9). A apresentação respiratória é

incomum (< 3% dos casos) com predominância no sexo masculino e associação com sintomas axiais (frequentemente camptocormia ou cabeça caída), fasciculações frequentes e generalizadas, com mobilidade dos membros preservada e significativa perda de peso no início da doença (10, 11).

A forma Esclerose Lateral Primária (ELP) (2 a 3,7% dos casos) ocorre quando os sintomas de NMS permanecem isolados após quatro anos do início dos sintomas, e é caracterizada por progressão mais lenta, pouca perda funcional e menos atrofia dos membros inferiores (MMII) (12,13). A idade de início é tipicamente entre 50 e 55 anos (5) e tem uma duração de doença mais longa (média de 11,2 anos DP: +/- 6,1) com uma mortalidade de 33% após 16 anos de seguimento (13).

A Atrofia Muscular Progressiva (AMP) caracteriza-se por acometimento exclusivo do NMI com prognóstico mais favorável que a forma clássica (14). São descritas duas subformas chamadas *Flail arm* e *Flail leg syndromes*.

A síndrome *flail arm* também chamada de amiotrofia braquial diplégica, variante escapuloumeral da AMP ou Síndrome do homem em barril é associada a melhor prognóstico, responde por 11% dos casos de ELA com grande predominância do sexo masculino (4:1) (15). Esta forma é caracterizada por atrofia simétrica e proximal dos membros superiores (MMSS) com importante perda funcional, e com pouco ou nenhum acometimento de MMII e bulbar (16,17,18).

A síndrome *flail leg* também conhecida como forma peroneal da ELA ou tipo Marie-Patrikios é caracterizada por fraqueza de MMII de início distal assimétrico com atrofia, ausência de reflexos, progressão lenta, discretos e tardios sinais de NMS (19). Apresenta um melhor prognóstico com sobrevida adicional de 5 a 6 anos (15).

A forma Paralisia Bulbar Progressiva é restrita a região bulbar, mais comum em mulheres, com pior prognóstico devido à insuficiência respiratória mais precoce e apresenta maior associação com comprometimento cognitivo Frontotemporal do que as outras formas de ELA (20). O predomínio do NMS resulta em disartria espástica, caracterizada por fala lentificada, trabalhosa, distorcida e, às vezes, nasal (21). Já o predomínio do NMI resulta em atrofia, fraqueza e fasciculação de língua com disartria flácida que se caracteriza por fala nasal, devido à fraqueza palatal, e rouquidão (21). A tosse é ineficaz e posteriormente há o aparecimento de disfagia, que leva a emagrecimento e desnutrição com piora do prognóstico (22).

Demência Frontotemporal (DFT) ocorre em 11 – 15 % dos pacientes. Mas a aplicação de testes cognitivos apropriados mostra alteração cognitiva em 35 - 50 %

dos pacientes com início pela função executiva, seguida por alteração de linguagem e memória (7,23, 24). Branco et al (25) demonstraram que pacientes com ELAs com alteração cognitiva apresentavam redução do volume da amígdala bilateral e tálamo esquerdo e pacientes com alteração comportamental apresentavam alteração do fornix em estudo de RM 3T (Ressonância Magnética 3 Tesla) de crânio.

1.1.2 - Genética

As formas familiares de ELA (ELAf) correspondem a 5 – 10% dos casos e podem ser transmitidas através de herança autossômica dominante, recessiva e ligada ao X, sendo a forma mais comum a autossômica dominante de início na idade adulta. A autossômica recessiva é mais rara e mais frequente nas formas juvenis, ELP ou paraplegia espástica-*like*. A forma dominante ligada ao X é mais raramente observada e é vista em famílias em que os pacientes masculinos tendem a mostrar fenótipos mais graves (26, 27).

Clinicamente não é possível distinguir um fenótipo específico para ELAf, mas alguns achados clínicos são sugestivos, como início em idade precoce, alteração de sensibilidade, início pelos MMII e curva bimodal de evolução (28,29).

O conhecimento sobre genética em ELA aumentou significativamente com o progresso das técnicas de biologia molecular, o que permitiu a identificação de mais de 20 novos genes nos últimos 10 anos (30). Tabela 1

Os genes ligados a ELA podem ser divididos em genes causadores e fatores genéticos que aumentam o risco de desenvolver ELA (31,32).

Variantes patogênicas associadas à ELAf também podem ser identificadas em indivíduos com ELAs (33,34). Portanto, mesmo a ELA aparentemente esporádica pode estar relacionada à atuação de algumas variantes genéticas que independentemente conferem um moderado ou baixo risco, mas que combinadas ou no contexto de exposição a algum fator ambiental determinam a doença. Este tipo de situação é chamado de herança oligogenética, em que uma única variante genética não é suficiente para causar a doença mas aumenta significativamente o risco e outra variante genética ou fator ambiental é necessário para causar a doença. Por outro lado, há genes associados a ELA que são implicados em outras condições como demência frontotemporal, ataxia cerebelar e doença de Parkinson, o que mostra uma característica pleiotrófica destes genes, ou seja, um gene particular pode resultar em diferentes doenças simultaneamente ou em indivíduos diferentes (6,35).

Condições como esquizofrenia, obesidade e hipertensão nas quais o risco de desenvolver a doença durante a vida é de aproximadamente 1% ou mais, são suficientemente comuns para aplicar a hipótese variante comum-doença comum. Já doenças raras com base genética são causadas por mutação genética em um único gene e o risco de desenvolver a doença é quase inevitável- a doença de Huntington é um exemplo. A ELA está entre estes dois extremos, sugerindo uma arquitetura genética intermediária (6).

Tabela 1 - Genes e loci ligados à Esclerose Lateral Amiotrófica familiar (ELAf)

ELAf (OMIM)	Locus	Gene	Abreviação	Herança	Características Clínicas	Hot Spot
ALS1 (# 105400)	21q22.1	Superoxido dismutase1	<i>SOD1</i>	AD, AR	ELAf	>150 mutações: A4V, D90A, G93C, I113T (maioria dos estudos)
ALS2 (* 606352)	2q33	Alsin	<i>ALS2</i>	AR	ELA forma Juvenil	Mutações Raras
ALS3 (% 606640)	18q21	Desconhecido		AD	ELAf	
ALS4 (# 602433)	9q34	Senataxina	<i>SETX</i>	AD	ELA forma Juvenil	Principais mutações: L389S, R2136H, T3I
ALS5 (* 610844)	15q15-21.1	Espatacsina	<i>SPG11</i>	AR	ELA forma Juvenil	Multiplos hot-spots
ALS6 (* 137070)	16p11.2	Fusion, derivada da translocação do 12 pelo 16, liposarcoma maligno	<i>FUS/TLS</i>	AD-AR	ELAf	Codon 521
ALS7 (% 608031)	20p13	desconhecido		AD	ELAf	
ALS8 (# 608627)	20q13.32	Vesícula associada à proteína B de membrana	<i>VAPB</i>	AD	ELAf	Principal mutação: Pro56Ser
ALS9 (# 611895)	14q11	Angiogenina	<i>ANG</i>	AD	ELAf	Mutações <i>Missense</i> : K17I
ALS10 (* 605078)	1p36.22	TAR DNA-ligadora da proteína 43	<i>TARDBP</i>	AD	ELAf	Principais mutações: A315, G348C, A382T
ALS11 (# 612577)	6q21	FIG4 fosfoinositide 5-fosfatase	<i>FIG4</i>	AD	ELAf	Raras mutações

ALS12 (# 613435)	10p13	Optineurina	<i>OPTN</i>	AD, AR	ELAf	Codons 398, 478
ALS13 (# 183090)	12q24.12	Ataxina-2	<i>ATXN2</i>	AD	ELAf	27–33 repetições CAG
ALS14 (# 613954)	9p13	Valosin-containing protein	<i>VCP</i>	AD	ELAf	Codons 151, 155, 159, 191, 592
ALS15 (# 300857)	Xp11	Ubiquilina 2	<i>UBQLN2</i>	Ligada ao X	ELAf	Principais mutações: Pro497His, Pro497Ser, P506T, P509S, P525S
ALS16 (# 614373)	9p13.3	Receptor Sigma-1	<i>SIGMAR1</i>	AR	ELAf	Codon 102
ALS17 (# 614696)	3p11	Charged multivesicular body Protein 2B	<i>CHMP2B</i>	AD	ELAf	Codons 29, 104, 206s
ALS18 (# 614808)	17p13	Profilina 1	<i>PFN1</i>	AD	ELAf	Raras mutações
ALS19 (# 615515)	2q34	Gene da Proteína Coriônica ERB.4	<i>ERBB4</i>	AD	ELAf	Códons 927, 1275
ALS20 (# 615426)	12q13	Ribonucleoproteína Nuclear Heterogênia A1	<i>HNRNPA1</i>	AD	ELAf	Raras mutações
ALS21 (# 606070)	5q31	Matrin 3	<i>MATR3</i>	AD	ELAf	Códons 622, 154, 85
ALS22 (# 616208)	2q35	Tubulina alfa-4A	<i>TUBA4A</i>	AD	ELAf	Raras mutações
ALS	12q24	Ácido D-Amino oxidase	<i>ADO</i>	AD	ELAf	Raras mutações
ALS	9q34		<i>GLE1</i>	AR	ELAf	Raras mutações
ALS	20q13	Sarcoma Sinovial	<i>SS18L1</i>		ELAf	Raras mutações
FTD-ALS1 (# 105550)	9p21	<i>Chromosome 9 open reading frame 72</i>	<i>C9ORF72</i>	AD	ELA, DFTL, ELA–DFTL	Repetições GGGGCC >30
FTD-ALS2 (* 615903)	22q11	<i>Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 10</i>	<i>CHCHD10</i>	AD	ELA, DFTL, ELA–DFTL	Codons 12, 15, 59, 66, 80
FTD-ALS3 (* 601530)	5q35.3	Sequestosoma 1	<i>SQSMT1</i>	AD	ELA, DFTL, ELA–DFTL	Códons ligados a ELA: 53, 259, 348, 439
FTD-ALS4 (* 604834)	12q14.2	TANK-ligadora de quinase 1	<i>TBK1</i>	AD	ELA, DFTL, ELA–DFTL	

AD: Autossômica Dominante; AR: Autossômica Recessiva; DFT: Demência Frontotemporal; DFTL: Degeneração Frontotemporal Lobar. Adaptado de Corcia et al. 2017 (29).

Principais genes relacionados a ELAf

ALS1: Cobre/Zinco superóxido dismutase (*SOD1*)

O gene *SOD1* foi o primeiro gene ligado a ELA (1993); ele codifica a metaloenzima homodimérica que catalisa a reação que transforma o superóxido em O_2 e H_2O_2 . O *SOD1* é responsável por cerca de 12% das ELAf e por 1% das ELAs (36). O número de mutações descobertas, neste gene, nas últimas duas décadas já ultrapassa 185 (27).

O fenótipo de ELA ligado à mutação *SOD1* apresenta-se com algumas especificidades que a distingue das ELAs: idade de início mais precoce, maior duração de doença, início em MMII e distúrbio cognitivo raro (30,36).

Globalmente, a mutação mais frequente no *SOD1* é a D90A em que o quadro clínico é paresia de MMII lentamente progressiva que gradualmente atinge MMSS, musculatura torácica e bulbar, associada a sintomas não motores atípicos com ataxia, neuralgia, sensação de calor e distúrbios vesicais. Entretanto, o fenótipo varia de acordo com a mutação presente no *SOD1*. Por exemplo, as mutações A4V, H43R, L84V, G85R, N86S e G93A estão associadas à rápida progressão de doença e sobrevida menor que três anos (27).

ALS10: Proteína de ligação RNA/ DNA TAR (*TDP-43*)

O gene *TARDBP* é localizado no *locus* 1p36 e codifica a proteína envolvida na maquinaria RNA/DNA. A proteína TDP-43 é o maior componente da inclusão citoplasmática ubiquitina positiva vista na ELA e na DFT. Quase todas as mutações estão localizadas no exon 6 na região C-terminal rica em glicina envolvida em interações proteína-proteína (24).

Mutações em *TARDBP* são responsáveis por 4% das ELAf e <1% das ELAs, mas na região da Sardenha esta mutação é responsável por 1/3 dos casos. Na população caucasiana, o início ocorre nos MMSS e com longo período de duração de doença (63 meses). Já na população asiática, a doença se inicia pela região bulbar (37).

**ALS6: Gene fundido em sarcoma / translocado em lipossarcoma
(*FUS/TLS*)**

A mutação no gene *FUS* pode ser transmitida através de herança autossômica dominante e autossômica recessiva. Da mesma maneira que a *TARDBP* a proteína *FUS* está envolvida na maquinaria de processamento RNA/DNA (38). Essa mutação é responsável por 4% das ELAf e extremamente rara na ELAs (39). A maioria das mutações está na região C-terminal e leva a uma distribuição citoplasmática aberrante. Quanto mais desorganizada esta distribuição, mais cedo a doença se inicia. Todas as mutações ligadas à ELA encontram-se no exon 13 (40, 41).

Algumas características são sugestivas de mutação *FUS*: idade de início menor que 40 anos, início predominantemente cervical e duração de doença menor que *SOD1* e *TARDBP* (quase 90% dos casos morrem em 4 anos do início dos sintomas) e acometimento cognitivo é raro (42, 43).

**ALS8: Proteína de membrana associada à vesícula associada à
Proteína B (*VAPB*)**

O gene *VAPB* se localiza no locus 20p13 e codifica a proteína envolvida no tráfico intracelular de vesículas e transporte de lipídios (29). A mutação foi descrita inicialmente em famílias brasileiras com doença do neurônio motor com os seguintes fenótipos: atrofia muscular espinhal de início tardio, ELA atípica com tremor postural e ELA típica (44). Além disso, muitos pacientes apresentam anormalidades autonômicas, incluindo constipação intestinal e disfunção sexual. A principal mutação p.P56S foi descrita no gene *VAPB* no Brasil, Japão, Reino Unido e Países Baixos (45).

ELA –DFT1: Cromossomo 9 *open reading frame 72* (*C9orf72*)

O hexanucleotídeo GGGGCC situado na região não codificante do gene *C9orf72* tem sido responsabilizado pela maior parte dos casos de ELA e DFT, principalmente em populações caucasianas, respondendo por 40% dos casos de ELAf na Europa e 50% das ELAf no Brasil (46). O gene está localizado no locus 9p21 e contém 12 exons (47). A penetrância desta variante é idade-dependente e estimada em 0% antes dos 35, 50% após os 60 anos e 100% após os 80 anos (48). A expansão

com mais de 30 repetições tem sido considerada patológica, mas não há relação entre o tamanho da repetição e o fenótipo ou a idade de início da doença (49, 50).

Alguns achados clínicos sugerem esta mutação: idade de início mais precoce (em média 1,8 a 5 anos mais cedo que a ELAs), alta frequência de início bulbar (por volta de 40%) e curta duração de doença (5,7 a 12 meses). Dois elementos chaves nesta mutação são a presença de DFT e história familiar de doença de Parkinson ou Parkinsonismo no exame físico (47, 51). O exame de imagem pode ajudar mostrando atrofia do lobo frontal bilateral e simétrica (predominantemente do lobo mesial) e o PET (Tomografia por Emissão de Pósitrons) pode mostrar hipometabolismo frontotemporal (52).

ALS13: Ataxina 2 (ATXN2)

A Ataxina-2, codificada pelo gene *ATXN2*, é uma proteína de ligação de RNA altamente conservada que regula o *splicing* de mRNA e a tradução de genes envolvidos no metabolismo e na estabilidade da membrana (53). O primeiro exon do gene *ATXN2* tem a sequência de repetição CAG em tandem que define a sequência de poliglutamina do seu produto (54). Na maioria dos indivíduos saudáveis, o número de repetições é 22-23 (55). As longas expansões de poliglutamina (polyQ), especificamente, expansões maiores do que 34 repetições CAG, causam a ataxia espinocerebelar tipo 2 (SCA2) (56). Elden et al (57) mostraram, em 2010, que a presença de repetições CAG intermediárias (entre 24 e 33) é um fator de risco para ELA em populações caucasianas.

A proteína de ligação RNA/DNA TAR (TDP-43) desempenha um papel central na neurodegeneração. Ela é normalmente encontrada no núcleo celular, mas tem sido demonstrada em agregados citoplasmáticos de neurônios e de células da glia de pacientes com DFT, Alzheimer, parkinsonismo e na maioria dos casos de ELAs (58,59). Elden et al (57) demonstraram que a proteína citoplasmática Ataxina 2 pode aumentar a toxicidade dos agregados de TDP-43 levando a morte dos neurônios motores em pacientes com ELA e que a presença de repetições CAG intermediárias (entre 27 e 33) no gene *ATXN2* é um fator de risco para desenvolver a doença.

Outros estudos populacionais confirmaram que a presença de repetições CAG intermediárias (entre 24 e 33) no gene *ATXN2* é um fator de risco para ELA, inclusive em populações não caucasianas, como a chinesa e taiwanesa (55,60,61).

A mutação no gene *ATXN2* tem, em relação à ELA, característica oligogênética, não é determinante, mas aumenta o risco de desenvolver a doença, e também característica pleiotrófica já que pode resultar em duas doenças diferentes ELA e SCA2. (6,53,54,56,57).

1.1.3 - Diagnóstico

O diagnóstico de ELA é feito por critérios clínicos com apoio de estudo eletroneuromiográfico (ENMG). Outros testes diagnósticos são realizados para excluir doenças que podem mimetizá-la (62). Os primeiros critérios diagnósticos foram definidos, em 1994, critério El Escorial, com objetivo de padronizar o diagnóstico para facilitar a entrada de pacientes em estudos clínicos (63) - Tabela 2. Foram criados quatro níveis de certeza diagnóstica nomeados como ELA definida, ELA provável, ELA possível e ELA suspeita, dependendo da disseminação dos sinais/sintomas de NMS e NMI em quatro regiões anatômicas definidas: bulbar, cervical, torácica e lombar.

Tabela 2 - Critério El Escorial

ELA clinicamente definida	Definida com evidência clínica de sinais de NMS e NMI na região bulbar e em pelo menos duas regiões espinhais
ELA clinicamente provável	Definida com evidência clínica de sinais de NMS e NMI em pelo menos duas regiões, com sinais de NMS necessariamente rostral (acima) dos sinais de NMI
ELA clinicamente possível	Definida quando os sinais de NMS e NMI estão em uma região ou sinais de NMS são encontrados sozinhos em duas ou mais regiões, ou sinais de NMI são encontrados rostralmente aos sinais de NMS (na ausência de

	evidencia de ENMG mostrando doença de NMI mais difusa)
ELA clinicamente suspeita	Definida com uma síndrome de NMI pura em que outras causas de doença de NMI foram adequadamente descartadas

Adaptado de Brooks BR et al: El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Sci. 1994; Jul; 124(Suppl.):96-107 (63).

Considerada uma classificação muito restritiva, ela foi revisada em 2000 para aumentar a sensibilidade diagnóstica. Os critérios diagnósticos revisados introduziram a contribuição da investigação eletrofisiológica ao diagnóstico de ELA ao adicionar a categoria ELA provável com suporte laboratorial e a categoria clinicamente suspeita foi retirada (64) Tabela 3.

Tabela 3 - Critério El Escorial- revisado

ELA clinicamente definida	Definida com evidência clínica de sinais de NMS e NMI na região bulbar e em pelo menos duas regiões espinhais
ELA clinicamente provável	Definida com evidência clínica de sinais de NMS e NMI em pelo menos duas regiões, com sinais de NMS necessariamente rostrais (acima) aos sinais de NMI
ELA clinicamente provável com suporte laboratorial	Definida quando os sinais de NMS e NMI estão em uma região, ou sinais de NMS estão presentes sozinhos em uma região – juntamente com sinais de NMI definido por ENMG em pelo menos duas regiões com apropriada aplicação de Neuroimagem e estudos laboratoriais para excluir outras causas
ELA clinicamente possível	Definida quando os sinais de NMS e NMI estão em uma região ou sinais de NMS são encontrados sozinhos em duas ou

	<p>mais regiões, ou sinais de NMI são encontrados rostralmente aos sinais de NMS e o diagnóstico de ELA clinicamente provável com suporte laboratorial não pode ser confirmado em conjunto com eletrodiagnóstico, neurofisiologia, neuroimagem ou testes laboratoriais. Outros diagnósticos devem ser excluídos para que o diagnóstico de ELA clinicamente possível possa ser aceito</p>
--	--

Adaptado de Brooks BR et al. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2000;1:293–9 (64)..

Apesar destes critérios terem atingido boa especificidade, sua sensibilidade continua discutível, especialmente nos estágios iniciais da doença resultando em atraso no diagnóstico e limitação no recrutamento de pacientes para estudos clínicos (62,65). Em 2008, um comitê de especialistas em neurofisiologia clínica publicou novos critérios – Awaji-shima – incluindo recomendações para o uso de dados eletrofisiológicos no diagnóstico de ELA (66). Estes critérios deram à ENMG o mesmo peso das anormalidades clínicas para identificações de alterações do NMI e a categoria ELA clinicamente provável com suporte laboratorial desapareceu. Estes critérios também igualaram a importância dos Potenciais de Fasciculação aos Potenciais (PF) de Fibrilação e Onda Positiva na demonstração de desnervação aguda, o que é essencial em termos práticos já que os PF aparecem primeiro (66). Vários estudos têm demonstrado a melhor sensibilidade dos critérios de Awaji-shima em relação aos critérios de EL Escorial revisados no diagnóstico de ELA (67,68,69,70,71), especialmente nos casos de início bulbar (72,73) - Tabela 4.

Tabela 4 - Critérios de Awaji-shima

ELA clinicamente definida	Definida pela evidência clínica ou eletrofisiológica de sinais de NMS e NMI na região bulbar e pelo menos duas regiões espinhais ou presença de sinais de NMS e NMI em três regiões espinhais.
ELA clinicamente provável	Definida pela evidência clínica ou eletrofisiológica de sinais de NMS e NMI em pelo menos duas regiões com os sinais de NMS necessariamente rostral (acima) aos sinais de NMI.
ELA clinicamente possível	Definida pela evidência clínica ou eletrofisiológica de sinais de NMS e NMI em pelo menos uma região; ou somente sinais de NMS em duas ou mais regiões; ou sinais de NMI rostral aos sinais de NMS. Neuroimagem e testes laboratoriais devem ser realizados e outros diagnósticos devem ser excluídos

Adaptado de de Carvalho M. et al. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. Clin Neurophysiol 2008;119:497–503 (66).

Estudos populacionais estimam que 8-10% dos pacientes que são encaminhados a um centro de referência terciário especializado em Doença do Neurônio Motor (DNM) apresentam outro diagnóstico e não ELA (74). Em alguns casos, mesmo para o especialista em DNM com investigação complementar apropriada (Ressonância Magnética de crânio e cervical, ENMG de quatro membros e exames laboratoriais), é difícil fechar o diagnóstico. Alguns pontos-chaves podem ajudar no diagnóstico diferencial (62) - Tabela 5.

Tabela 5 - Diagnóstico Diferencial em ELA

Sinais Predominantes/ Forma de DNM	Diagnóstico Diferencial	Principais diferenças (sinais/ testes diagnósticos)
NMS/ELP	Esclerose Múltipla Primariamente Progressiva	Sinais e sintomas não Motores (olhos, bexiga, cerebelo) / PEV, RM, LCR para estudo de banda oligoclonal
Mistura de NMS e NMI/ ELA	Mielorradiculopatia	Sinais de NMS caudais aos de NMI, sinais sensitivos, alteração de esfíncter / RM de coluna com cortes axiais
NMI/ AMP com rápida progressão	Envenenamento por chumbo Paraneoplásico Doença infecciosa	Início com neuropatia do radial, achados extramotors (dor abdominal, encefalopatia) / níveis sanguíneos de chumbo, Esfregaço de sangue para eritrócitos pontilhados e anemia Síndrome de NMI rapidamente progressiva, sinais extra-motors: Neuronopatia sensitiva, disautonomia, envolvimento de SNC/LCR inflamatório, FDG-PET/CT, anticorpos antineuronais (principalmente anti-Hu) Síndrome Polio- <i>like</i> , sinais extra neurológicos/ sorologia para HIV, Lyme, febre do oeste do Nilo

NMI/ AMP com progressão lenta	Doença de Kennedy	Lentamente progressiva, envolvimento bulbar com atrofia da língua desproporcional a disartria, tremor nas mãos, ginecomastia/ mistura de neuropatia espinobulbar motora com neuropatia sensitiva/ ENMG, teste genético
	Síndrome Motoras Hereditárias	Síndrome de NMI pura. História familiar, sinais clínicos indicando cronicidade/ teste genético de acordo com fenótipo
	Miopatia por corpúsculos de inclusão	Atrofia e fraqueza com predileção pelo quadríceps e flexor longo dos dedos/ padrão pseudoneurogênico na ENMG, alterações característica na biópsia muscular
NMI/ AMP com progressão lenta e Síndrome focal regional	Radiculopatia Cervical / Lombar	Dor e fasciculações restritas a área de fraqueza e atrofia / RM de coluna
	Doença de Hirayama	Início Juvenil, amiotrofia monomélica do braço/ distribuição C7-T1 no ENMG, RM de coluna cervical na posição fletida (compressão dural anterior)
	Síndrome Pós-Polio	Antecedente de pólio/ ENMG confirmando história de pólio
	MNMBC	Distribuição Multifocal, fraqueza desproporcional a atrofia, evidência de bloqueio de condução na ENMG, AC GM1, RM de plexo braquial Passado de radioterapia, fraqueza desproporcional a atrofia e restrita aos MMII/ contraste da cauda equina na RM, mioquimia na ENMG
	Radiculopatia Lombossacral pós-radiação	

MNMBC: Neuropatia Motora Multifocal com Bloqueio de condução; PEV: Potencial Evocado Visual; LCR: Líquido Cefalorraquiano; RM: Ressonância Magnética; ENMG: Eletro-neuromiografia. Adaptado de Lenglet T, Camdessanché JP. Amyotrophic lateral sclerosis or not: Keys for the diagnosis. Rev Neurol. 2017;173(5):280-87 (62).

Apesar de todos os esforços em melhorar as classificações existentes, elas se prestam mais aos estudos clínicos do que ao diagnóstico (75). Por exemplo, AMP forma com apresentação pura de NMI não preenche os critérios El Escorial e Awajishima mesmo apresentando a mesma progressão, prognóstico e alterações neuropatológicas. Inclusive pacientes com a forma clássica da doença só preenchem os critérios para ELA provável e definida nas fases mais avançadas da doença (76). Além disso, um paciente pode ser classificado como ELA possível e o especialista não ter dúvida sobre o diagnóstico devido aos achados clínicos e a exclusão de outras hipóteses. Estas diferenças entre a classificação e o diagnóstico não ajudam na prática clínica diária e podem ser confusas em termos de comunicação ao paciente (77).

Devido à dificuldade na confirmação diagnóstica e ao péssimo prognóstico da ELA, há grande esforço em se encontrar um biomarcador tanto para diagnóstico como prognóstico. Além disso, um biomarcador contribuiria com desenvolvimento de novas drogas, ajudando a avaliar a progressão da doença e a eficácia do tratamento (78).

1.1.4 - Biomarcador

Um biomarcador é definido como uma medida objetiva que atua como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos e resposta farmacológica a intervenções terapêuticas (79). Um biomarcador ideal deve exibir alta especificidade e sensibilidade para distinguir pacientes de controles populacionais e monitorizar a progressão da doença em pacientes individuais (78).

Grande atenção tem sido dada aos biomarcadores em fluídos corporais, principalmente, no líquido e sangue. No líquido devido a sua proximidade com o SNC e no sangue devido ao seu fácil acesso, entre eles estão os neurofilamentos (80,81,82,83), marcadores inflamatórios (84,85,86,87), marcadores metabólicos (88,89,90) e a cisteína (91,92,93). Mas nenhum deles mostrou especificidade e sensibilidade para tornar-se uma ferramenta diagnóstica ou prognóstica.

1.1.5 - MicroRNAs

Os MicroRNAs (miRNAs) têm sido apontados como potenciais biomarcadores em várias enfermidades (94). Eles são pequenos RNAs não codificantes que possuem de 18 a 24 nucleotídeos e são considerados um dos mais importantes reguladores da expressão gênica pós-transcricional (95,96,97). Aproximadamente 60% de todos os genes codificadores de proteínas são regulados por miRNAs (98).

Ambros et al. (99) descreveram, em 1993, o gene *lin-4* responsável por alterações no desenvolvimento larval de *Caenorhabditis elegans* e verificaram que esse gene possuía transcritos de 22nt e que não codificava proteína alguma, além de estar numa região intrônica do genoma do animal. Posteriormente, demonstraram, que o transcrito de 22nt pareava por complementaridade com a região 3' não traduzida (3'UTR) do gene *lin-14* e regulava de forma negativa a expressão deste gene (100).

Em 2000, o miRNA let-7 foi clonado em *C. elegans* (101) e demonstraram-se as mesmas características de parear-se a região 3'UTR de outro gene, o *lin-41* e de inibir sua tradução. A sequência do let-7 se mostrou altamente conservada na maioria dos organismos (102). A partir de então os miRNAs foram descritos de insetos a mamíferos (98, 103, 104, 105). Atualmente, o banco de dados de sequências de microRNAs, miRBase ([http://www.mirbase.org/versão 21](http://www.mirbase.org/versão%2021)), contém mais de 30.000 sequências maduras distintas de microRNAs entre vertebrados, invertebrados, plantas e vírus, totalizando mais de 200 espécies.

Os miRNAs atuam de forma preferencialmente negativa na expressão gênica através de ligação altamente específica à região 3' não traduzida (3' UTR) complementar ao RNA mensageiro (RNAm) alvo. A perfeita complementariedade entre o miRNA e o RNAm alvo resulta no silenciamento gênico pela degradação do RNAm, enquanto que o imperfeito pareamento resulta na repressão da tradução o que ocorre na maior parte dos casos. Essas moléculas são tecido-específicas e agem de forma temporal e espacialmente regulada durante o desenvolvimento. Predições computacionais sugerem que cada miRNA pode atuar em até 200 transcritos e um RNAm pode ser regulado por milhares de miRNA (106,107).

Os miRNAs são formados a partir da transcrição do gene de miRNA (Figura 1), que leva à formação do pri-miRNA. Este recebe a adição da estrutura cap e da cauda poliA (108). Em seguida o pri-miRNA é processado pela RNase III Drosha,

formando uma estrutura em formato de *hairpin* com um tamanho aproximado de 60-70 nucleotídeos chamado de pré-miRNA (106). O pré-RNA é transportado, com auxílio da enzima transportina 5 (108), do núcleo para o citoplasma onde é submetido a um segundo processamento realizado pela enzima Dicer (outra RNase III) que remove a alça da estrutura *hairpin* e forma um miRNA dupla fita. O duplex é então separado e uma das fitas será selecionada como miRNA maduro e fará parte do complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*), enquanto a fita complementar será removida e degradada (106).

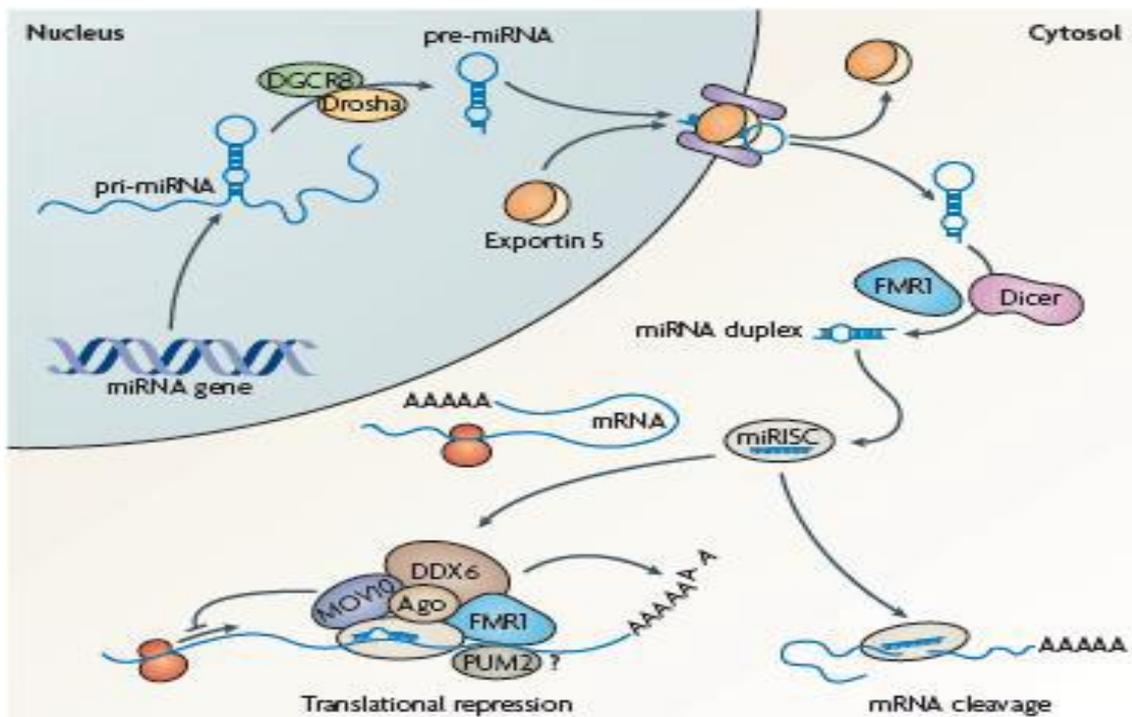


Figura 1 - Biogênese e modo de ação dos miRNAs: transcrição do gene Mir gerando o pri-microRNA com estrutura secundária em *hairpin*; formação do pré-microRNA através da clivagem do pri-microRNA pela DROSHA; transporte do pré-microRNA pela exportina-5 para o citoplasma; o pré-miRNA é processado pela enzima Dicer que remove a alça da estrutura *hairpin* e forma um miRNA duplex; o duplex é separado e uma das fitas será selecionada como miRNA maduro e se ligará ao complexo RISC; o miRNA ligado ao complexo RISC se ligará ao mRNA. A perfeita complementaridade entre o microRNA e o RNAm alvo resulta em degradação do RNAm, enquanto que o imperfeito pareamento resulta na repressão da tradução. Adaptado de Schratt G. MicroRNAs at the synapse. Nat Rev Neurosci. 2009 Dec;10(12):842-9 (110).

Os miRNAs são reguladores finos de vários processos biológicos com perfil de expressão tecido e tempo-específicos, regulando funções como controle do desenvolvimento, diferenciação celular, apoptose, proliferação celular e organogênese (104,109). Quando encontrados em fluídos extracelulares como plasma sanguíneo, soro, urina, saliva, sêmen e líquido cefalorraquidiano são chamados miRNAs circulantes (111,112,113). Estes têm sido apontados como

potenciais biomarcadores não-invasivos para diagnóstico e prognóstico de doenças. São considerados altamente estáveis nos fluidos corporais, pois se apresentam em formas que garantem sua proteção contra a ação da RNases, tais como exosomas, corpos apoptóticos, microvesículas (onde estão encapsulados), complexos com proteínas da família AGO e associados a frações de lipoproteínas de alta densidade (HDL) (114,115) (Figura 2).

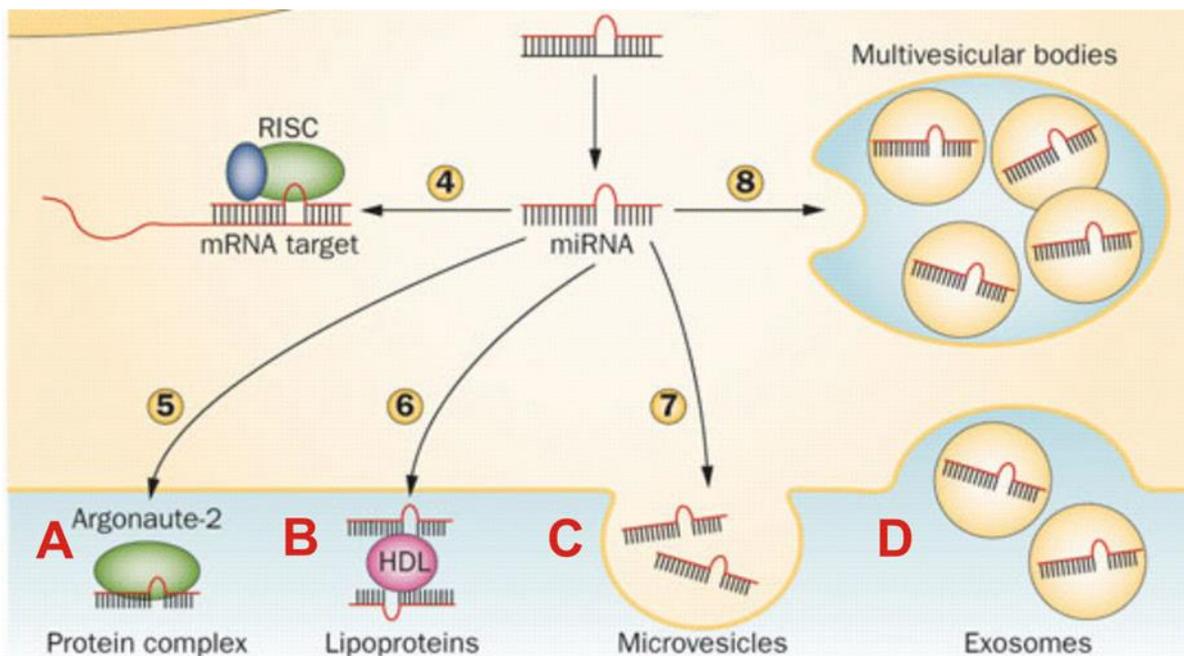


Figura 2 - Mecanismos de liberação celular e sistemas extracelulares de transporte de microRNAs. Os microRNAs circulantes podem ser protegidos e liberados nos fluidos corporais de quatro maneiras: A) em complexos com proteína da família AGO; B) associados a frações de lipoproteínas de alta densidade (HDL); C) em microvesículas e, D) dentro de exosomas. Adaptado de Guay C and Regazzi R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2013 Sep;9(9):513-21(115).

Os primeiros relatos do papel de miRNAs circulantes como biomarcadores diagnósticos e prognósticos foram em neoplasias (116,117). Posteriormente, foram publicados estudos de miRNAs em doenças do SNC como Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson, Esclerose Múltipla, Doença de Huntington e Atrofia de Múltiplos Sistemas (118,119,120,121,122).

De Felice *et al* (123) estudaram miRNAs, em diferentes tecidos, de pacientes com ELA e controles saudáveis e encontraram o miR-338-3p hiperexpresso nos leucócitos, soro, líquido e tecido da medula espinhal dos pacientes em relação aos controles. Houve ainda aumento da expressão do miR-338-3p nos leucócitos dos

pacientes, no acompanhamento em diferentes fases da doença, e ao comparar os níveis de miR-338-3p nos leucócitos de pacientes com ELA em relação a pacientes com outras doenças neurodegenerativas (Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson e Doença de Huntington).

Toivonen et al (124) estudaram a expressão de miRNAs em músculo esquelético do modelo murino transgênico de ELA (camundongo SOD1-G93A). Entre os miRNAs alterados nas diversas idades, gêneros e grupos musculares, o miR-206 foi o único consistentemente alterado durante o curso da doença e também se mostrou aumentado na circulação dos animais sintomáticos e em um grupo de 12 pacientes com ELA.

1.1.6 - Justificativa

Diante do exposto, percebe-se que há diversos aspectos ligados à fisiopatologia e etiologia da ELA que dificultam tanto o diagnóstico quanto o tratamento dos pacientes.

Os miRNAs com suas características de expressão tecido e tempo-específicos (103,109) e de estabilidade nos fluidos corporais (114,115) podem ser uma ferramenta precisa e acessível na prática clínica para diminuir o tempo de diagnóstico e início do tratamento e também para avaliar o prognóstico. A identificação mais precoce dos pacientes também é importante para realização de estudos clínicos que terão pacientes com menos tempo de doença, e conseqüente menor lesão neuronal, o que aumenta a chance de desenvolvimento de novas drogas mais eficazes.

Em relação ao cenário brasileiro, existem diferenças notáveis em comparação com as séries norte-americanas e europeias, provavelmente justificadas pela origem étnica multirracial da população que descende de caucasianos, ameríndios, asiáticos e africanos (125). Por exemplo, o perfil genético da ELA em nosso meio parece ser distinto, com baixa frequência de mutação nos genes *SOD1* e *C9orf72* e maior presença da mutação no gene *VAPB* (27,44,126). Além disso, a idade de início nos pacientes brasileiros é inferior, em média uma década a menos (126,127). Desta forma, estudos clínicos e genéticos em coortes nacionais são necessários para avançar no manejo de nossos pacientes com ELA.

Com o intuito de contribuir na busca por um marcador diagnóstico e prognóstico e de melhor conhecer a genética ligada a ELA no Brasil, utilizamos ferramentas de biologia molecular para estudar miRNAS e o gene da Ataxina 2 em coortes brasileiras.

2 - Objetivos

2.1 - Objetivos Gerais

Investigar um marcador diagnóstico e prognóstico para ELA e melhor conhecer a genética ligada a ELA no Brasil

2.2 - Objetivos Específicos

Objetivos relacionados ao trabalho apresentado no capítulo 1 (miRNAs)

- Investigar o perfil de expressão dos miRNAs em músculo e plasma de pacientes com ELA
- Avaliar se a expressão plasmática dos miRNAs se relaciona com a progressão da doença, utilizando parâmetros clínicos, em um ano de seguimento

Objetivos relacionados ao trabalho apresentado no capítulo 2 (Gene *ATXN2*)

- Avaliar se o alelo intermediário do gene *ATXN2* confere risco aumentado para desenvolver ELA na população brasileira
- Determinar se há um perfil clínico específico da ELA relacionada ao gene *ATXN2* no Brasil

3 - Metodologia

3.1 - Capítulo 1 – Metodologia do artigo de miRNAs

3.1.1 - Desenho do Estudo

Microarray com 847 miRNAs

Biópsia de músculo esquelético de 5 pacientes



Validação dos resultados (PCR *real time*)

Biópsia de músculo esquelético de 5 pacientes



11 microRNAs diferencialmente expressos



Validação de 3 microRNAs em amostra de plasma (PCR *real time*)

(n= 39 pacientes e 39 controles)



**Foram encontradas 3 microRNAs anormalmente
expressos no plasma (miRNA 206 e 424)**



**Investigação da correlação da expressão dos
miRNAs 206 e 424 com parâmetros clínicos
(n=39 ELAs)**

3.1.2 - Seleção de Sujeitos

Foram selecionados pacientes que faziam seguimento regular no ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital das Clínicas da UNICAMP entre 2012 e 2013. Todos preencheram critério para ELA definida ou provável segundo o critério El

Escorial revisado (64). Todos os pacientes foram submetidos a eletroneuromiografia e preencheram os critérios eletrofisiológicos de Awaji (66). Não foram incluídos pacientes com acometimento exclusivo do neurônio motor superior (Esclerose Lateral Primária), neurônio motor inferior (Amiotrofia Muscular Progressiva) ou com apresentação bulbar. Todos os pacientes foram genotipados para as expansões do GGGGCC no gene *C9orf72*, mas nenhum deles apresentou resultado positivo.

3.1.3 - Análise de expressão em amostras de músculo esquelético

Cinco pacientes (média idade de $50,6 \pm 14,3$ anos, 3 homens) com diagnóstico de ELA definida ou ELA provável de acordo com os critérios de El Escorial foram submetidos à biópsia aberta de músculo bíceps braquial. Estas amostras foram submetidas à rotina histológica e coloração enzimática para avaliar a extensão da desnervação. Posteriormente, foi realizado *microarray* e PCR em tempo real para avaliar a expressão diferencial de miRNAs entre pacientes e controles. As amostras controle de músculo bíceps braquial foram provenientes de cinco pacientes submetidos a biópsia devido à mialgia (idade média de $40,1 \pm 15,1$ anos, 2 homens) com CK e histologia normais.

3.1.4 - Análise de expressão em plasma

Foram coletadas amostras de sangue de 39 pacientes e 39 controles saudáveis que foram utilizadas para isolar o plasma e, em seguida, para experimentos com PCR em tempo real, conforme detalhado abaixo.

3.1.5 - Avaliação clínica

Todos os 39 pacientes foram submetidos à avaliação clínica detalhada na primeira avaliação. Após 6 e 12 meses da primeira visita, foi possível avaliar novamente 19 e 12 pacientes, respectivamente. Quinze pacientes não puderam retornar por limitações clínicas e doze pacientes foram a óbito. Para quantificar a gravidade da doença em cada avaliação foram utilizadas a versão revisada da Escala de Classificação Funcional da ELA - ALSFRS (128), a Escala de Gravidade da ELA (ALSSS) (129) e *Medical Research Council (MRC) sumscore*.

3.1.6 - Isolamento de RNA

Tecido: a fração enriquecida de miRNA foi isolada com Kit MiRNeasy (Qiagen®), seguindo as instruções do fabricante. A qualidade do RNA extraído foi avaliada com Agilent 2100 Bioanalyzer™ (Agilent®, Santa Clara, CA) e a quantidade foi determinada usando Nanodrop™ (Thermo Scientific®, Waltham, MA).

Plasma: o sangue periférico (4 ml) foi colocado em tubos EDTA. Em até 3 h, os tubos foram submetidos a centrifugação a 515x g durante 10 min a 4°C. Em seguida, alíquotas de 1 ml do plasma foram transferidas para tubos de 1,5 ml e centrifugadas a 16.000 g durante 10 min a 4°C para sedimentar qualquer detrito celular restante. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para novos tubos e armazenado a -80°C. A fração enriquecida de miRNAs foi extraída, utilizando-se o kit de isolamento miRNA MirVana PARIS™, de 625 µl de amostra de plasma conforme as instruções do fabricante (Ambion®, Austin, TX). O volume final de eluição foi de 35 µl de água sem RNase. A pureza de RNA extraído foi quantificada usando o espectrofotômetro NanoDrop™ 1000.

3.1.7 - Análise genética do *Chip miRNAarray*

O perfil de miRNA microarray em amostras de músculo esquelético foi avaliado com 300 ng de pequenos RNAs enriquecidos e isolados pela plataforma Affymetrix® GeneChip™ miRNAarray (Santa Clara, CA, EUA, versão 1.0), que avalia 847 miRNA humanos, de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Utilizamos o pacote RankProd Bioconductor para comparar a expressão de miRNA entre as amostras de pacientes e controles, e depois a estratégia FDR para ajustar as múltiplas comparações e o limiar de 0,05.

3.1.8 - Transcrição reversa e PCR quantitativa em tempo real

Um volume fixo de 5 µl de fração enriquecida de pequenos RNAs obtida da amostra foi utilizada na reação de transcrição reversa (RT). Para síntese de cada cDNA específico de miRNA, o miRNA foi transcrito reversamente usando o kit de transcrição reversa de miRNA TaqMan (Life Technologies®, Foster City, CA, EUA) em um volume de reação de 15 µl contendo 1 x tampão RT, 0,15 µl de dNTP 100 mM, 0,19 µl de inibidor de RNase (20 unidades / µl), 1 µl de Transcriptase reversa MultiScribe™ (50 unidades / µl) e 3 µl de cada um dos *stem-loop primers* de miRNA. Usamos os seguintes *primers*: hsa-miR-886 (ID2193), hsa-miR-206 (MIMAT0000462, ID510), hsa-miR-424 (MIMAT0001341, ID604) para os miRNAs candidatos identificados em ELA e RNU48 (ID1006), hsa-miR-16 (MIMAT0000069, ID391) e hsa-miR-191 (MIMAT0000440, ID2299) para controles endógenos (Life Technologies®). A mistura foi incubada a 16°C durante 30 min, 42°C durante 30 min e 85°C por 5 minutos. Os ensaios TaqMan™ (Life Technologies®) foram utilizados para a quantificação de transcritos de miRNA maduros seguindo as recomendações do fabricante. Os experimentos com qPCR foram realizados em triplicatas com um volume final de 12 µl, contendo 6,25 µl de Master Mix, 0,625 µl de sonda (20 ×), 1,125 µl de água sem RNase e 4 µl de cDNA. As condições de PCR foram 95°C durante 10 min e 45 ciclos de 95°C durante 15 s e 60°C para 1min, realizado em 7500 termocycler™ (Life Technologies®). Os dados foram analisados utilizando-se o software DataAssist (Life Technologies®, versão 3.01) que determina o ciclo de limiar (Ct). As quantidades relativas de miRNA foram calculadas utilizando-se o método 2- $\Delta\Delta$ Ct após a normalização para RNU48 em tecido e hsa-miR-16 em amostras de plasma.

3.1.9 - Previsões computacionais para alvos de miRNAs humanos

Supostos genes alvos dos miRNAs diferencialmente expressos foram previstos utilizando-se o algoritmo miRGen (versão2.0) (130). Para refinar a seleção, candidatos com maior probabilidade de atuar na fisiopatologia da ELA foram pesquisados, através da procura por palavras-chave "neurônio motor", "nervo periférico", "sinapse", "Junção neuromuscular" e "músculo". Além disso, buscamos na literatura por candidatos adicionais, como os miRNAs que regulam genes envolvidos na ELA, incluindo genes identificados como causadores de ELA. Para refinar ainda mais a pesquisa, utilizamos o RNAhybrid programa que também oferece predição de alvos de microRNAs e que consiste em determinar o sitio de hibridização mais favorável entre um determinado microRNA e seu possível alvo, utilizando como parâmetro a termodinâmica dessa interação, baseado na busca dos menores valores de energia livre mínima (do inglês, minimum free energy (MFE)). Em outras palavras, quanto menor for a MFE mais forte será a ligação entre um microRNA e seu potencial alvo. Este algoritmo também oferece a opção de escolher a inclusão ou não de regiões de despareamento, como a presença de polimorfismo de Nucleotídeo Simples (SNP) dentro da região seed da interação microRNA/alvo, que possibilita visualizar a repercussão desse despareamento com base na MFE e suas consequências prováveis para a doença estudada (131).

3.1.10 - Análise Estatística

Foi utilizada estatística descritiva (média \pm desvio padrão e proporções) para apresentar dados clínicos e demográficos de pacientes e controles. Os níveis plasmáticos de expressão de miRNA não apresentaram distribuição normal, então foi realizada transformação logarítmica desses valores, resultando em distribuições com melhor simetria, assim a hipoexpressão e a hiperexpressão apresentaram intervalos com a mesma magnitude. Em todas as análises posteriores, empregou-se valores log-transformados de miRNA 206 e 424. O teste t de Student foi utilizado para comparar os níveis plasmáticos de miRNA entre pacientes e controles. Posteriormente, o método *Generalized Estimating Equations (GEE)* foi utilizado para investigar se os níveis de expressão desses miRNAs estariam correlacionados com a duração da doença, idade dos pacientes e gravidade da doença na primeira avaliação. A variação

longitudinal dos níveis plasmáticos de miRNA no grupo de pacientes foi avaliada usando os resultados do modelo anteriormente mencionado (miRNA vs.duração). O *GEE* também foi empregado para investigar se os níveis de miRNA na primeira visita se correlacionaram com a taxa de progressão da doença ao longo do tempo (expressa como variação em ALSFRS, ALSSS e índice de soma MRC). Em todas as análises, foram estabelecidos os limiares para p-valores < 0,05.

3.2 - Capítulo 2 – Metodologia do artigo do Gene *ATXN2*

3.2.1 - Seleção dos Sujeitos

Foram incluídos 459 pacientes, sem parentesco, sendo 372 ELAs e 87 ELA^f e 468 controles normais. Estes pacientes foram recrutados, entre 2011 e 2017, de seis centros de referência em doenças neuromusculares/ Neurogenética do Brasil: Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto (USP-RP), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). O diagnóstico foi realizado em cada Universidade por neurologistas especializados em doenças neuromusculares, segundo o critério El Escorial revisado (64). Somente pacientes que preencheram os critérios para ELA definida ou provável foram incluídos no estudo. Foram obtidos dados sobre a idade de início da doença e das principais características fenotípicas dos mesmos.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Unicamp e um consentimento informado, por escrito, foi obtido de todos os pacientes.

3.2.2 - Estudo Molecular

O DNA genômico (DNA_g) foi extraído de linfócitos de sangue periférico seguindo técnicas padronizadas (132). Realizamos reações em cadeia da polimerase (PCR) para determinar o comprimento dos alelos normais e expandidos no exon 1 do gene *ATXN2*. O volume final para cada ensaio foi 10µl: 50ng de DNA_g; 125mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 2,5 pmol de cada primer; Tris-HCl 20mM; MgCl₂ 1,75mM; KCl 50mM e 1,5 Unidades de TaqDNA polimerase. Os produtos de PCR foram resolvidos usando eletroforese capilar no seqüenciador ABI 3500 xl

(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O comprimento das repetições (CAG) foi determinado por comparação com marcadores padrões (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para verificar se os comprimentos de repetição CAG foram medidos corretamente, foram desenhados primers que flanqueiam o exon 1 do gene *ATXN2* e em seguida, realizado o sequenciamento da região em um subconjunto de 15 amostras para aferir o tamanho do segmento expandido. O comprimento de repetição estimado (CAG) foi então comparado usando ambos os métodos.

3.2.3 - Análise Estatística

Foi utilizada estatística descritiva para caracterizar o perfil demográfico e clínico dos pacientes. Posteriormente, teste Qui-quadrado foi utilizado para comparar a frequência de expansões intermediárias do gene *ATXN2* entre pacientes com ELA e controles. Um modelo de regressão logística foi empregado para determinar o risco associado à presença desta variante. Os pacientes com expansões intermediárias foram então comparados com aqueles sem expansões em termos de parâmetros clínicos e demográficos usando o teste t de Student. Todas as análises foram realizadas no software SYSTAT v12.0 e níveis de significância definidos em $p < 0,05$.

4 - Resultados

Capítulo 1 – artigo de miRNAS (133)

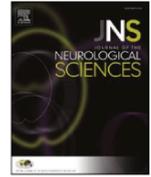
Resumo dos Resultados

Foram obtidas biópsias de músculo esquelético de cinco pacientes com ELA (três mulheres e dois homens com média de idade de 50,6 anos). A análise histológica revelou em todas as amostras desnervação ativa e crônica expressa por agrupamento de fibras, fibras atróficas anguladas e núcleos internos proeminentes.

A análise de *microarray* de tecido músculo esquelético identificou 11 microRNAs diferencialmente expressos: miR-424, miR-503, miR- 886-3p, miR-542-5p, miR-34a, miR-886-5p, miR- 146b-5p, miR-504, miR-21, miR-214 and miR-183. miR424, miR-214 e miR-206 foram validados por qPCR em amostras de músculo ($p < 0,005$). No plasma, apenas o miR-424 e miR-206 apresentaram-se significativamente hiperexpressos em pacientes com ELA.

Em seguida, avaliamos se a expressão plasmática de miR-206 e miR-424 estava correlacionado com parâmetros clínicos (idade, duração da doença e gravidade da doença) no início do estudo. Nestas análises, a única variável significativamente associada aos níveis plasmáticos de hsa-miR-424 em pacientes foi a idade ($p = 0,0049$). Nenhuma variável apresentou correlação significativa com níveis de miR-206.

Não houve alteração significativa ao longo do tempo nos níveis de miR-206 e hsa-miR-424 após 6 e 12 meses de acompanhamento. Apesar disso, os níveis séricos basais mais elevados de ambos miRNAs foram preditivos de uma mudança mais lenta na pontuação da soma do MRC.



MicroRNAs-424 and 206 are potential prognostic markers in spinal onset amyotrophic lateral sclerosis



Helen M.T. de Andrade^a, Milena de Albuquerque^a, Simoni H. Avansini^b, Cristiane de S. Rocha^b, Danyella B. Dogini^b, Anamarli Nucci^a, Benilton Carvalho^b, Iscia Lopes-Cendes^b, Marcondes C. França Jr.^{a,*}

^a Department of Neurology, School of Medicine, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

^b Department of Medical Genetics, School of Medicine, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 March 2016

Received in revised form 19 June 2016

Accepted 21 June 2016

Available online 22 June 2016

Keywords:

MicroRNA

Amyotrophic lateral sclerosis

Skeletal muscle

Motor neuron

Prognosis

ABSTRACT

Introduction: Skeletal muscle microRNAs (miRNAs) are potential candidate biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) that deserve further investigation.

Objectives: To identify miRNAs abnormally expressed in the skeletal muscle and plasma of patients with ALS, and to correlate them with parameters of disease progression.

Methods: Expression profile of miRNAs in muscle was evaluated using an array platform. Subsequently we assessed the plasmatic expression of candidate miRNAs in a set of 39 patients/39 controls. We employed generalized estimating equations to investigate correlations with clinical data.

Results: We identified 11 miRNAs differentially expressed in the muscle of ALS patients; of these, miR424, miR-214 and miR-206 were validated by qPCR in muscle samples. In plasma, we found only miR-424 and miR 206 to be overexpressed. Baseline expression of miR-424 and 206 correlated with clinical deterioration over time.

Conclusion: MiR-424 and miR-206 are potential prognostic markers for ALS.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the prototypical motor neuron disease and the 3rd most frequent neurodegenerative disorder in adults [1]. The disease is characterized by progressive skeletal muscle weakness and atrophy that culminate in fatal respiratory paralysis within 3–5 years of disease onset [2]. There is no diagnostic test for ALS, and diagnosis still depends on clinical assessments [3]. This limitation results in a diagnostic delay of one year on average. In this setting, biomarkers are urgently needed to ease the specific diagnosis of ALS diagnosis and to help establish prognosis early in the disease course as well as to act as outcome measures in upcoming clinical trials [4].

MicroRNAs (miRNAs) are small molecules that can influence posttranscriptionally gene expression of a variety of transcript targets, and can be released into the circulation by normal and pathologically affected tissues [4]. Because miRNAs are stable in plasma and serum, they are promising potential biomarkers and have been extensively studied in several human illnesses, such as cancer [5], Alzheimer's disease [6–8], Parkinson's disease [9], multiple sclerosis [10], Huntington's disease [11] and multiple system atrophy [12].

Some studies investigated the role of miRNAs in amyotrophic lateral sclerosis. Most of them employed animal models of the disease and identified abnormal expression of miRNAs involved with skeletal muscle integrity [13–15]. However, there are few studies involving patients with ALS, and most of them focused on miRNA expression in tissue samples from deceased patients [4,15]. In two previous studies using serum samples of living patients, miRNA-206 and 338-3p were proposed as potential biomarkers for the disease [15–16]. However, some important issues were not properly addressed in these studies, such as the correlation with clinical parameters and longitudinal assessment.

Therefore, we designed the present study to investigate the expression profile of miRNAs in skeletal muscle and plasma of a representative cohort of patients with ALS. In addition, we assessed whether plasma expression of miRNAs differentially expressed in patients could be related to disease progression. To accomplish that, we correlated expression data with clinical parameters of disease progression over 1 year of follow-up.

2. Methods

2.1. Study design

We summarized the different steps of the study design in Fig. 1.

* Corresponding author at: Department of Neurology, University of Campinas – UNICAMP, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, Campinas, SP 13083-887, Brazil.

E-mail address: mcfrancajr@uol.com.br (M.C. França).

2.2. Subjects' selection and protocol approvals

We enrolled patients with definite and probable ALS according to El Escorial criteria regularly followed at the Neuromuscular Outpatient Clinic at UNICAMP hospital between 2012 and 2013 [3]. Every patient underwent a comprehensive nerve conduction/EMG evaluation and fulfilled the Awaji neurophysiological criteria [17]. We did not include patients with exclusive upper (i.e., primary lateral sclerosis) or lower motor neuron (i.e., progressive muscular atrophy, flail syndromes) involvement, or with bulbar presentation. All patients were genotyped for GGGGCC expansions at the gene *C9orf72* but none of them tested positive.

Subjects with concomitant unrelated neurological diseases were excluded as well. We also selected a group of age and gender matched healthy subjects to be used as a control group.

This study was approved by our institution Ethics Committee and a written informed consent was obtained from all participants prior to any study-related procedure.

2.2.1. Expression analyses in skeletal muscle samples

We performed open biopsies of biceps brachii muscle of 5 patients with definite and probable ALS according to El Escorial criteria (mean age of 50.6 ± 14.3 years, 3 men). In all patients, the force of the biopsied muscle was graded as 4/5 (MRC scale). At the time of biopsy, patients were moderately disabled (mean ALSFRS score of 25, range 21–28), but had preserved respiratory function (forced vital capacity >70% of predicted). None of them had family history of motor neuron disease, and screening for GGGGCC expansions at the *C9orf72* gene proved negative in all 5 subjects. These samples underwent routine histological and enzymatic staining to assess the extent of denervation. They were then used in microarray and real-time PCR experiments to assess the differential expression of miRNAs between patients and controls (described below). These control samples of skeletal muscle came from five matched subjects that underwent biceps brachii biopsy for clinical investigation (mean age of 40.1 ± 15.1 years, 2 men). These individuals presented myalgia as the sole complaint (without weakness) without laboratorial abnormalities (normal CK levels) and entirely normal histology (seen by a board-certified neuropathologist).

2.2.2. Expression analyses in plasma

We collected blood samples from 39 patients and 39 healthy controls. These were used for plasma isolation and then for real time PCR experiments, as detailed below.

2.3. Clinical evaluation

All 39 patients underwent detailed clinical evaluation at baseline. After 6 and 12 months, we were able to reassess 19 and 12 patients, respectively. The remaining patients were lost to follow-up ($n = 15$) or died ($n = 12$). We employed the revised version of the ALS functional rating scale [18], ALS severity scale (ALSSS) [19] and Medical Research Council (MRC) sumscore to quantify disease severity at each point in time.

2.4. Laboratorial procedures and in silico analysis

2.4.1. RNA isolation

Tissue: miRNAs enriched fraction was isolated with miRNeasy Kit (Qiagen®), following the manufacturer instructions. The extracted RNA was assessed for quality with Agilent 2100 Bioanalyzer™ (Agilent®, Santa Clara, CA) and quantity was determined using Nanodrop™ (Thermo Scientific®, Waltham, MA).

Plasma: Peripheral blood (4 ml) was drawn into EDTA tubes. Within 3 h, the tubes were subjected to centrifugation at $515 \times g$ for 10 min, 4°C . Next, 1 ml aliquots of the plasma were transferred to 1.5 ml tubes and centrifuged at $16,000 g$ for 10 min, 4°C to pellet any remaining cellular debris. Subsequently, the supernatant was transferred to fresh tubes and stored at -80°C . Small RNA enriched fraction was extracted using the mirVana PARIS™ miRNA isolation kit from 625 μl of plasma sample following the manufacturer's instructions (Ambion®, Austin, TX). The final elution volume was 35 μl RNase-free water. The purity of extracted RNA was quantified using NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer.

2.4.2. Gene Chip miRNAarray analysis

MiRNA microarray profiling in skeletal muscle samples was assessed with 300 ng of isolated enriched small RNA by Affymetrix® GeneChip™ platform miRNA array (Santa Clara, CA, USA, version 1.0), which

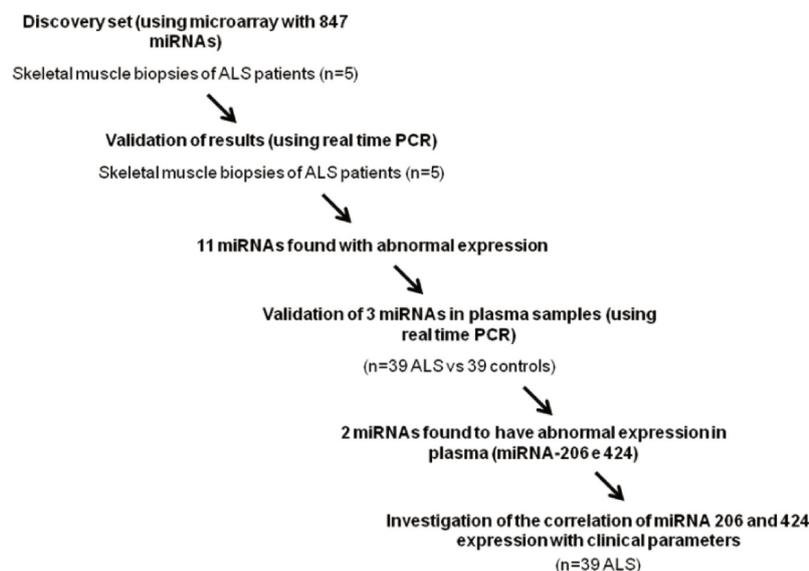


Fig. 1. Design of the study: Discovery phase done with a microRNA array in muscle tissue ($n = 5$), followed by validation in muscle and plasma ($n = 39$) and correlation with clinical parameters ($n = 39$).

interrogates a total of 847 human miRNAs, according to the manufacturer recommended protocol. We used the RankProd Bioconductor package to compare the miRNA expression between ALS and control samples, using the FDR strategy to adjust for multiple comparisons and the threshold of 0.05.

2.4.3. Choice of candidate miRNAs for plasma analyses

MiRNAs were considered differentially expressed when the Fold Change (FC) was greater than the absolute value of 2 and FDR-corrected $p < 0.05$. From the 11 differentially expressed miRNAs identified in the skeletal muscle of patients with ALS, we selected three (hsa-miR-424, hsa-miR-214 and hsa-miR-886-5p) to further evaluate in plasma samples. These 3 were chosen after careful search at the Diana database (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/>), which evaluates miRNA targets. Within this database, we selected miRNAs that are likely to modulate expression of genes involved with the development, maintenance and functioning of skeletal muscle, synapse and peripheral nerve. In addition, we included hsa-miR-206 in these analyses, because it was previously reported as abnormally expressed in patients with ALS [16].

2.4.4. Reverse transcription and quantitative real-time PCR

A fixed volume of 5 μ l of small RNA enriched fraction obtained of a given sample was used as an input into a reverse transcription (RT) reaction. For synthesis of each miRNA-specific cDNA, miRNA was reverse transcribed using TaqMan miRNA reverse transcription kit (Life Technologies®, Foster City, CA, USA) in a 15 μ l reaction volume containing 1 \times RT buffer, 0.15 μ l of 100 mM dNTPs, 0.19 μ l of RNase inhibitor (20 units/ μ l), 1 μ l of MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 units/ μ l) and 3 μ l of each of the miRNA specific stem-loop primers. We used the following primers: hsa-miR-886 (ID2193), hsa-miR-206 (MIMAT0000462, ID510), hsa-miR-424 (MIMAT0001341, ID604) for the candidate miRNAs identified in ALS and RNU48 (ID1006), hsa-miR-16 (MIMAT0000069, ID391) and hsa-miR-191 (MIMAT0000440, ID2299) for endogenous controls (Life Technologies®). The mixture was incubated at 16 °C for 30 min, 42 °C for 30 min and 85 °C for 5 min. We used the TaqMan™ (Life Technologies®) assays for the quantification of mature miRNA transcripts following the manufacturer recommendations. qPCR experiments were performed in triplicate in a final volume of 12 μ l, containing 6.25 μ l Master Mix, 0.625 μ l probe (20 \times), 1.125 μ l of RNase-free water and 4 μ l cDNA. PCR conditions were 95 °C for 10 min, and 45 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min, carried out in 7500 thermocycler™ (Life Technologies®). We analyzed the data using the DataAssist software (Life Technologies®, version 3.01), determining the threshold cycle (Ct). Relative quantities of miRNA were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method after normalization to the RNU48 in tissue and hsa-miR-16 in plasma samples.

2.5. Computational predictions for human miRNA targets

Putative target genes of differentially expressed miRNAs were predicted using the miRGen algorithm (version2.0) [20]. To refine the selection, we looked at the candidates more likely to be involved in ALS, searching for the keywords “motor neuron”, “peripheral nerve”, “synapse”, “neuromuscular junction” and “muscle”. In addition, we searched the literature for additional candidates, such as miRNAs believed to

regulate genes involved in ALS, including causative genes identified in familial ALS. To further refine the search, we used the RNAhybrid [21], searching for the lowest values of minimal free energy (MFE) and miRNA:SNP interactions.

3. Statistical analysis

Clinical and demographic data of patients and controls are presented with descriptive statistics (mean \pm standard deviation and proportions). Plasma miRNA expression levels did not present a normal distribution, so we performed a logarithmic transformation of these values, resulting in distributions with better symmetry, given that at this point under-expression and over-expression are represented by intervals of same magnitude. In all further analyses, we employed log-transformed values of miRNA 206 and 424. We used a 2 sample *t*-test to compare plasmatic miRNA levels between patients and controls; because data on controls are available only at one timepoint, the *t*-test, generalized linear models (GLM) and generalized estimating equations (GEE) provide equivalent results. Afterwards, we used GEE to investigate whether or not the expression levels of these miRNAs correlated with disease duration, age and disease severity at baseline. Longitudinal change of plasma miRNA levels within the patient group was evaluated using the results of the aforementioned (miRNA vs. duration) model. We also employed GEE to investigate whether miRNA levels at baseline correlated with the rate of disease progression over time (expressed as variation in ALSFRS, ALSSS and MRC sum score). In all analyses, we set the thresholds for *p*-values to 0.05.

4. Results

Skeletal muscle biopsies were obtained from five patients with ALS (three women and two men with a mean age of 50.6 years). In all these samples, histological analyses revealed active and chronic denervation expressed by fiber type grouping, angulated atrophic fibers and prominent internal nuclei. Clinical and demographic data of the 39 patients and 39 controls that underwent miRNA analyses in plasma are detailed in Table 1.

Microarray analyses identified 11 differentially expressed miRNAs in the skeletal muscle of ALS patients: hsa-miR-424, hsa-miR-503, hsa-miR-886-3p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-34a, hsa-miR-886-5p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-504, hsa-miR-21, hsa-miR-214 and hsa-miR-183 (Fig. 2). Hsa-miR424, hsa-miR-214 and hsa-miR-206 were validated by qPCR in muscle samples ($p < 0.05$ for all - Supplemental Fig. 1). In plasma, we found that only hsa-miR-424 and hsa-miR-206 were significantly overexpressed in patients with ALS (Fig. 3).

Abnormal expression of hsa-miR-206 has been previously described in human and experimental ALS, and target genes already identified (please refer to the discussion section for further comments). Regarding hsa-miR-424, we identified some potential gene targets through in silico analyses. According to the <http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/> database, hsa-miR-424 is predicted to modulate the expression of genes involved with axonal transport within motor neurons (*KIF1b*) and genes that encode several sarcolemmal and sarcomeric proteins (*TPM2*, *MYL1*, *MYH7B*). Some of these targets were already validated experimentally, such as TPM2 (mirtarbase). Using other platforms

Table 1

Clinical and demographic data of the 39 patients with spinal onset ALS and 39 controls that underwent miRNA analyses in plasma.

Characteristics	Baseline (n = 39)	6 month follow-up (n = 19)	12 month follow-up (n = 12)	Controls (n = 39)
Age (mean \pm SD, years)	52.2 \pm 10.5	52.4 \pm 10.2	50.9 \pm 11.0	52.6 \pm 10.8
Gender (M/F)	20/19	9/10	6/5	24/15
Age at onset (mean \pm SD, years)	49.9 \pm 10.55	48.9 \pm 10.3	46.8 \pm 11.2	-
Disease duration (mean \pm SD, months)	26.7 \pm 21.9	41.6 \pm 27.7	49.2 \pm 28.7	-
ALSFERS score (mean \pm SD)	27.5 \pm 9.6	22.3 \pm 11.4	24.7 \pm 11.8	-
ALSSS score (mean \pm SD)	24.4 \pm 7.7	21.3 \pm 8.1	22.7 \pm 8.9	-
MRC score (mean \pm SD)	57.8 \pm 28.2	48.5 \pm 29.6	46.5 \pm 25.3	-

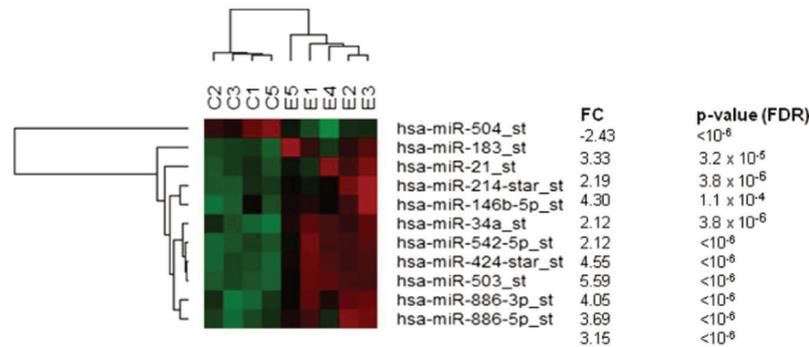


Fig. 2. Hierarchical clustering showing the 11 miRNAs found to be differentially expressed in skeletal muscle of patients with ALS (E) in comparison with controls (C). Red: up-regulated miRNAs; green: down-regulated miRNAs; black: no change. Only those miRNAs that presented a Fold Change (FC) greater than the absolute value of 2 and FDR-corrected p-value < 0.05 are shown. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(RNHybrid and MIRgen), we identified the *VAPB* (vesicle-associated membrane protein-associated protein B) gene to be another probable target for hsa-miR-424.

We then assessed whether plasma expression of hsa-miR-206 and hsa-miR-424 is correlated with clinical parameters (age, disease duration and disease severity) at baseline. In these models, the only variable significantly associated with plasmatic hsa-miR-424 levels in patients was age ($p = 0.0049$). No variable presented significant correlations with hsa-miR-206 levels.

There was no significant change over time in the levels of hsa-miR-206 and hsa-miR-424 after 6 and 12 months of follow-up. We then stratified patients in two groups: A) mild/early cases (ALSFRS at baseline >24); B) severe/late cases (ALSFRS at baseline <25), and attempted to compare the longitudinal course of the microRNAs in each group. There was no between-group significant difference in terms of plasma expression change (Table 2).

Despite that, we found that higher baseline serum levels of both miRNAs predicted slower change in the MRC sum score (Fig. 4).

5. Discussion

In this study, we have identified 11 differentially expressed miRNAs in the muscle samples using a “wide net” panel approach. From these, hsa-miR-424 had increased plasma expression. In this array-based analysis, hsa-miR-206 muscle expression was actually higher in the ALS group (FC = 2.52), but it did not survive the FDR correction ($p > 0.05$). Despite that, we pursued the investigation of this microRNA

in plasma because of previous reports [16] and indeed found it to be remarkably overexpressed in plasma.

Hsa-miR-206 is a skeletal muscle-specific miRNA in humans that influences the formation of new NMJs following nerve injury and therefore plays an important role in the reinnervation of denervated muscles [15]. Hsa-miR-206 expression is controlled by myogenic regulatory transcription factors including myogenin and MyoD that are also upregulated by denervation [16]. In transgenic SOD1 G93A mice knocked-out for the hsa-miR-206 gene, there was delayed and incomplete muscular reinnervation in comparison to those animals that expressed hsa-miR-206 [15]. These experimental results suggest that hsa-miR-206 overexpression might be protective for the disease. In line with that, we have found that higher plasma levels of this miRNA at baseline predicted slower clinical deterioration over 12 months.

Hsa-miR-206 was overexpressed both in plasma and skeletal muscle of patients with ALS, but overexpression was not progressive over 6 and 12 months of follow-up. Although this might seem counterintuitive, we believe it might be explained by the behavior of hsa-miR-206 expression during the course of the disease. We hypothesize that hsa-miR-206 expression increases early in the disease course, reaches a plateau and then begins to fall. This occurs in parallel to the loss of skeletal muscle in the disease, which is the tissue where hsa-miR-206 is overexpressed. This hypothesis is supported by experimental data from Toivonen et al. that found a progressive increase in the plasmatic expression of hsa-miR-206 in G93A-SOD1 transgenic mice up to 120 days of life when it began to fall (terminal illness phase). When we look carefully at the clinical profile of our cohort in the baseline, there were patients with severe and long-standing disease mixed with

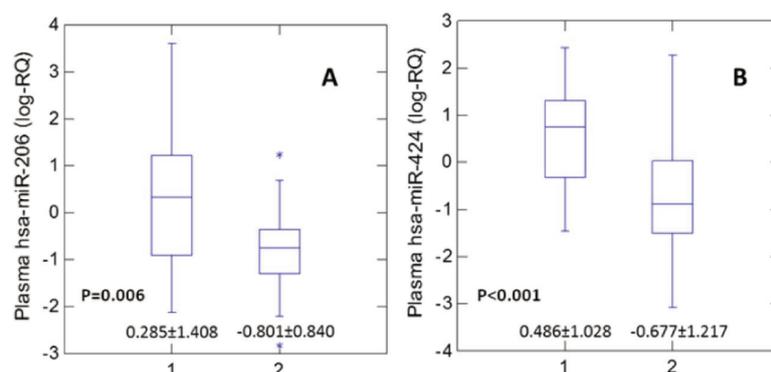


Fig. 3. Box and whiskers plot showing plasma expression of hsa-miR-206 (A) and hsa-miR-424 (B) in patients with ALS (group 1) and healthy controls (group 2). Results are shown as log-transformed values of RQ.

Table 2
Plasma expression longitudinal change of hsa-miR206 and 424 stratified for disease stage at baseline.

	Mild group	Severe group	p-value
Delta logRQ-hsa-miR206	0.692 ± 1.415	−0.211 ± 1.498	0.212
Delta logRQ-hsa-miR424	0.580 ± 0.823	0.162 ± 1.467	0.438

Delta = Measurement at T2 – Measurement at T1.

recently diagnosed patients. It is thus possible that lumping all these subjects together for longitudinal analyses might have biased our results. Results shown in Table 2 are actually in line with that. Although not significant, they suggest that plasma expression of hsa-miR206 increases in the mild/early group, but actually decreases in the late/severe group. Regarding hsa-miR424, both groups had increased values, but in the mild group the effect was almost 3 times higher than in the severe group.

We found hsa-miR-424 to be overexpressed in the plasma and skeletal muscle of patients with ALS. On clinical grounds, hsa-miR-424 plasma levels at baseline also correlated inversely with disease progression. There are few studies that implicated this miRNA in neurological diseases, but none in the ALS [22–26]. The current study was not specifically designed to investigate the molecular mechanisms that link hsa-miR424 and ALS. However, in silico analyses provided interesting information about the possible role of hsa-miR-424 in ALS, and this might generate hypotheses to be tested in future studies. Using different databases and prediction algorithms, we identified a set of genes that are probable targets for this microRNA. These include genes involved with axonal transport within motor neurons (*KIF1b*) and genes that encode several sarcolemmal and sarcomeric proteins (*TPM2*, *MYL1*, *MYH7B*). Recently, the gene target *TPM2* was validated in experiments that

employed a NGS-based approach [27]. However, the most appealing candidate is *VAPB*; mutations in this gene cause familial ALS type 8. Using three different softwares (RNHybrid, miRdb and MIRgen), we identified a binding site for hsa-miR-424 at the 3'UTR of *VAPB*. These results indeed suggest that hsa-miR-424 might down regulate the expression of *VAPB*. This phenomenon also appears to take place in patients with ALS type 8 [28]. Further experimental studies should be performed to confirm this possible relevant interaction between *VAPB* and hsa-miR-424.

Our findings correlating plasma microRNA levels and clinical deterioration in patients with ALS are especially relevant, since the most significant association was found with MRC sum score, rather than ALSFRS and ALSSS. MRC sum score is a direct measure of the strength of the patients (mostly related to lower motor neuron integrity), and not a functional scale such as ALSFRS and ALSSS. Therefore, it is reasonable to assume that it really correlates better with the expression level of skeletal muscle microRNAs. Therefore, it seems that both hsa-miR-424 and hsa-miR-206 are reliable markers of lower motor neuron/skeletal muscle damage in patients with ALS. It would be interesting now to evaluate these molecules in those subjects with predominant or exclusive upper motor neuron signs. Perhaps, quantification of these microRNAs would enable earlier recognition of lower motor neuron dysfunction in these patients.

In conclusion, our results add information about microRNAs in the context of human ALS and highlight their potential use as prognostic markers. However, they should be viewed as promising but preliminary, particularly because of our small sample size in the discovery phase. In addition, we had a large drop-out rate in the follow up, so that our longitudinal results might reflect the behavior of slow progressors, but not of fast progressors. Further studies with larger cohorts and longer follow-up periods are still certainly needed. In addition, it would be

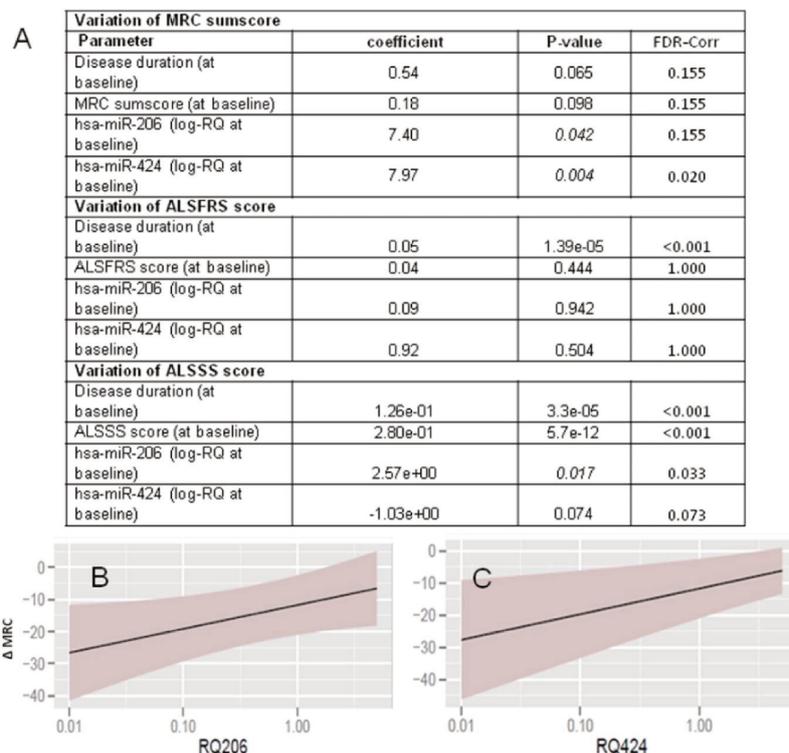


Fig. 4. Results of generalized estimating equations showing the correlation of clinical deterioration over time and baseline plasma expression of hsa-miR-206 and 424 in patients with ALS. (A) Table showing the coefficients and p-values for each parameter included in the models (for MRC, ALSFRS and ALSSS scores). (B/C) Schematic plots showing the predicted variation of MRC sumscores after one year for a hypothetical patient according to the baseline levels of hsa-miR-206 (B) and hsa-miR-424 (C). These plots were obtained assuming that the values of MRC sumscore, disease duration and the expression levels of the other miR at baseline remained stable.

important in future studies to adjust plasma expression of muscle-specific microRNAs for individual muscle mass.

Abbreviations

ALS	amyotrophic lateral sclerosis
ALSFRS	amyotrophic lateral sclerosis functional rating scale.
ALSSS	amyotrophic lateral sclerosis severity scale
GEE	generalized estimating equations
GLM	generalized linear model
MiRNA	microRNA
MRC	Medical Research Council

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2016.06.046>.

Financial disclosures

Helen Maia Tavares de Andrade: Dr. Andrade reports no disclosures.
 Milena de Albuquerque: Dr. Albuquerque reports no disclosures.
 Simoni Helena Avansini: Dr. Avansini reports no disclosures.
 Cristiane de Souza Rocha: Dr. Rocha reports no disclosures.
 Danyella Barbosa Dogini: Dr. Dogini reports no disclosures.
 Anamarli Nucci: Dr. Nucci reports no disclosures.
 Benilton Carvalho: Dr. Carvalho reports no disclosures.
 Iscia Lopes-Cendes: Dr. Lopes-Cendes reports no disclosures.
 Marcondes C França Jr.: Dr. França Jr. reports no disclosures.

Acknowledgement

This work was supported by Conselho Nacional de Pesquisas – CNPq (470428/2011-2) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2013/01766-7).

References

- [1] L.H. Goldstein, S. Abrahams, Changes in cognition and behavior in amyotrophic lateral sclerosis: nature of impairment and implications for assessment, *Lancet Neurol.* 12 (2013) 368–380.
- [2] G. Bensimon, L. Lacomblez, V. Meininger, A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group, *N. Engl. J. Med.* 330 (1994) 585–591.
- [3] B.R. Brooks, R.G. Miller, M. Swash, T.L. Munsat, El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis, *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* 1 (2000) 293–299.
- [4] F. Cloutier, A. Marrero, C. O'Connell, P.J. Morin, MicroRNAs as potential circulating biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis, *J. Mol. Neurosci.* 56 (2015) 102–112.
- [5] P.S. Mitchell, R.K. Parkin, E.M. Kroh, B.R. Fritz, S.K. Wyman, E.L. Pogosva-Agadjanyan, et al., Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 10513–10518.
- [6] H. Geekiyanage, C. Chan, MicroRNA-137/181c regulates serine palmitoyltransferase and in turn amyloid β , novel targets in sporadic Alzheimer's disease, *J. Neurosci.* 31 (2011) 14820–14830.
- [7] P. Smith, A. Al Hashimi, J. Girard, C. Delay, S.S. Hébert, In vivo regulation of amyloid precursor protein neuronal splicing by microRNAs, *J. Neurochem.* 116 (2011) 240–247.
- [8] W.X. Wang, Q. Huang, Y. Hu, A.J. Stromberg, P.T. Nelson, Patterns of microRNA expression in normal and early Alzheimer's disease human temporal cortex: white matter versus gray matter, *Acta Neuropathol.* 121 (2011) 193–205.
- [9] A. Serafin, L. Foco, S. Zanigni, H. Blankenburg, A. Picard, A. Zanon, Overexpression of blood microRNAs 103a, 30b, and 29a in l-dopa-treated patients with PD, *Neurology* 17 (84) (2015) 645–653.
- [10] R. Gandhi, B. Healy, T. Gholipour, S. Egorova, A. Musallam, M.S. Hussain, et al., Circulating MicroRNAs as biomarkers for disease staging in multiple sclerosis, *Ann. Neurol.* 73 (2013) 729–740.
- [11] S.T. Lee, K. Chu, W.S. Im, H.J. Yoon, J.Y. Im, J.E. Park, et al., Altered microRNA regulation in Huntington's disease models, *Exp. Neurol.* 227 (2011) 172–179.
- [12] K. Ubhi, E. Rockenstein, C. Kragh, C. Inglis, B. Spencer, S. Michael, et al., Widespread microRNA dysregulation in multiple system atrophy - disease-related alteration in miR-96, *Eur. J. Neurosci.* 39 (2014) 1026–1041.
- [13] G. Bruneteau, T. Simonet, S. Bauché, N. Mandjee, E. Malfatti, E. Girard, et al., Muscle histone deacetylase 4 upregulation in amyotrophic lateral sclerosis: potential role in reinnervation ability and disease progression, *Brain* 136 (2013) 2359–2368.
- [14] A.H. Williams, G. Valdez, V. Moresi, X. Qi, J. McAnally, J.L. Elliott, et al., MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice, *Science* 326 (2009) 1549–1554.
- [15] B. De Felice, M. Guida, M. Guida, C. Coppola, G. De Mieri, R. Cotrufo, A miRNA signature in leukocytes from sporadic amyotrophic lateral sclerosis, *Gene* 508 (2012) 35–40.
- [16] J.M. Toivonen, R. Manzano, S. Olivan, P. Zaragoza, A. Garcia-Redondo, R. Osta, MicroRNA-206: a potential circulating biomarker candidate for amyotrophic lateral sclerosis, *Plos One* 9 (2014) 1–13.
- [17] M. Carvalho, R. Dengler, A. Eisen, J.D. England, R. Kaji, J. Kimura, et al., Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS, *Clin. Neurophysiol.* 119 (2008) 497–503.
- [18] Cedarbaum JM, Stambler N, Malta E, Fuller C, Hilt D, Thurmond B, Nakanishi A. The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that in corporates assessments of respiratory function. BDNF ALS Study Group (phase III). *J Neurol Sci*1999;169:13–21.
- [19] A.D. Hillel, R.M. Miller, K. Yorkston, E. McDonald, F.H. Norris, N. Konikow, Amyotrophic lateral sclerosis severity scale, *Neuroepidemiology* 8 (1989) 142–150.
- [20] P. Alexiou, T. Vergoulis, M. Gleditsch, G. Prekas, T. Dalamagas, M. Megraw, et al., miRGen 2.0: a database of microRNA genomic information and regulation, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) D137–D141.
- [21] J. Krüger, R. M., RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible, *Nucleic Acids Res.* 1 (34) (2006) W451–W454.
- [22] M.I. Alvarez-Mora, L. Rodriguez-Revenga, I. Madrigal, F. Torres-Silva, E. Mateu-Huertas, E. Lizano, et al., MicroRNA expression profiling in blood from fragile X-associated tremor/ataxia syndrome patients, *Genes Brain Behav.* 12 (2013) 595–603.
- [23] L. Yang, J. Wang, X. Sun, Y. Cao, S. Ning, H. Zhang, et al., Identifying a polymorphic 'switch' that influences miRNAs' regulation of a myasthenia gravis risk pathway, *PLoS One* 9 (2014), e104827.
- [24] W.X. Wang, Q. Huang, Y. Hu, A.J. Stromberg, P.T. Nelson, Patterns of microRNA expression in normal and early Alzheimer's disease human temporal cortex: white matter versus gray matter, *Acta Neuropathol.* 121 (2011) 193–205.
- [25] K. Kunze, U. Gamerding, J. LeSig-Owlanj, M. Sorokina, A. Brobeil, M.K. Tur, et al., Detection of an activated JAK3 variant and a Xq26.3 microdeletion causing loss of PHF6 and miR-424 expression in myelodysplastic syndromes by combined targeted next generation sequencing and SNP array analysis, *Pathol. Res. Pract.* 210 (2014) 369–376.
- [26] H. Zhao, J. Wang, L. Gao, R. Wang, X. Liu, Z. Gao, et al., MiRNA-424 protects against permanent focal cerebral ischemia injury in mice involving suppressing microglia activation, *Stroke* 44 (2013) 1706–1713.
- [27] A.W. Whisnant, H.P. Bogerd, O. Flores, P. Ho, J.G. Powers, N. Sharova, et al., In-depth analysis of the interaction of HIV-1 with cellular microRNA biogenesis and effector mechanisms, *MBio* 4 (2013), e000193.
- [28] E. Kabashi, H. Oussini, V. Bercier, F. Gros-Louis, P.N. Valdmanis, J. McDearmid, et al., Investigating the contribution of VAPB/ALS8 loss of function in amyotrophic lateral sclerosis, *Hum. Mol. Genet.* 22 (2013) 2350–2360.

Capítulo 2 – artigo do gene *ATXN2*

Resumo dos Resultados

A maioria dos indivíduos incluídos neste estudo (pacientes e controles) apresentam homozigose com 22 ou 23 repetições ou heterozigose com 22/23 repetições no gene *ATXN2*.

Alelos intermediários *ATXN2* (≥ 26) foram detectados em 29 pacientes (6,3%) e em 12 controles (2,56%) ($p = 0,005$). O comprimento médio da repetição CAG em pacientes e controles com alelos intermediários foram 30 (variação 26-34) e 28 (variação 27-35). A regressão logística revelou que expansões de comprimento intermediário (maiores que 26 repetições) estavam associadas a um risco aumentado de desenvolver ELA (odds ratio = 2,56, 95% CI: 1,29 - 5,08, $p = 0,005$).

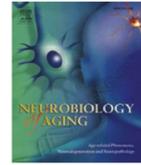
A maioria dos pacientes com expansões intermediárias apresentou ELA clássica com envolvimento combinado de neurônios motores superiores e inferiores ($n = 20/29$). No entanto, também houve fenótipos com envolvimento predominante do neurônio motor inferior ($n = 7$) e do neurônio motor superior ($n = 2$). Um único paciente apresentou demência associada. Ataxia clínica não foi identificada em nenhum paciente. Em seguida, comparamos o fenótipo clínico de pacientes com e sem expansões CAG. No grupo positivo para *ATXN2*, houve 7 dos 29 pacientes tinham história familiar positiva (24,1%). Em contraste, identificamos 80/430 indivíduos com FALS no subgrupo *ATXN2*-negativo (18,6%). A proporção de mulheres em ambos os subgrupos de ELA foi semelhante (48% x 39%, $p = 0,377$). A idade de início também foi semelhante nos dois grupos (*ATXN2* (+): $49,2 \pm 12,5$ vs *ATXN2* (-): $48,6 \pm 13,6$, $p = 0,804$).



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Aging

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuaging

Brief communication

Intermediate-length CAG repeat in *ATXN2* is associated with increased risk for amyotrophic lateral sclerosis in Brazilian patients

Helen Maia Tavares de Andrade^a, Vívian Pedigone Cintra^b, Milena de Albuquerque^a, Camila Callegari Piccinin^a, Luciana Cardoso Bonadia^c, Rafael Esteves Duarte Couteiro^b, Daniel Sabino de Oliveira^b, Rinaldo Claudino^d, Marcos Vinícius Magno Gonçalves^d, Mario Emilio Teixeira Dourado Jr^e, Leonardo Cruz de Souza^{f,g}, Antônio Lúcio Teixeira^{f,g}, Laura de Godoy Rousseff Prado^g, Vitor Tumas^b, Acary Souza Bulle Oliveira^h, Anamarli Nucci^a, Iscia Lopes-Cendes^c, Wilson Marques Jr^b, Marcondes C. França Jr^{a,*}

^a Department of Neurology, School of Medicine, University of Campinas—UNICAMP, Campinas, SP, Brazil^b Department of Neurosciences and Behavior Sciences, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo (HCFMRP-USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil^c Department of Medical Genetics, School of Medicine, University of Campinas—UNICAMP, Campinas, SP, Brazil^d Department of Neurology, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima, Trindade, Brazil^e Department of Neurology, Federal University of Rio Grande do Norte, Campus Universitário Lagoa Nova, Natal, RN, Brazil^f Department of Internal Medicine, Faculdade de Medicina Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil^g Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil^h Department of Neurology, Neuromuscular Disorders Unit, Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 January 2018

Received in revised form 24 March 2018

Accepted 28 April 2018

Keywords:

ALS

ATXN2 gene

Brazilian patients

Risk factor

ABSTRACT

Intermediate-length cytosine-adenine-guanine nucleotide repeat expansions in the *ATXN2* gene (which encodes for the protein Ataxin-2) have been linked to increased risk for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in different populations. There is no such study in the Brazilian population, which has a mixed ethnic background. We have thus selected 459 patients with ALS (372 Sporadic ALS and 87 Familial ALS) and 468 control subjects from 6 Brazilian centers to investigate this point. We performed polymerase chain reaction to determine the length of the *ATXN2* alleles. Polymerase chain reaction products were resolved using capillary electrophoresis on ABI 3500 × 1 capillary sequencer. We found that *ATXN2* intermediate-length expansions (larger than 26 repeats) were associated with an increased risk for ALS (odds ratio = 2.56, 95% confidence interval: 1.29–5.08, $p = 0.005$). Phenotype in patients with and without *ATXN2* expansions was similar. Our findings support the hypothesis that *ATXN2* plays an important role in the pathogenesis of ALS also in the Brazilian population.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by upper and lower motor neuron damage resulting in progressive paralysis and death (Cady et al., 2015). The sporadic form (sporadic ALS [SALS]) accounts for 90%–95% of all cases, and the familial form (familial ALS [FALS]) corresponds to the remaining 5%–10% of cases (Highley et al., 2016). Despite the large research efforts, causes or risk factors for SALS remain largely unknown. Several genes have been related to the pathogenesis of

FALS, such as *SOD1* (Rosen et al., 1993), *TARDBP* (Neumann et al., 2006), *FUS* (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009), and *C9orf72* (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011), which account for a significant number of ALS cases. The contribution of many other genes to ALS is still not fully clear because variants have just been identified in the last few years (Soong et al., 2014).

Ataxin-2, encoded by the *ATXN2* gene, is a highly conserved RNA-binding protein that regulates mRNA splicing and translation of genes involved in metabolism and membrane stability (Lastres-Becker et al., 2008). The first exon of the *ATXN2* gene bears the tandem cytosine-adenine-guanine nucleotide (CAG) repeat sequence that defines the polyglutamine sequence of its product (Imbert et al., 1996). In most healthy individuals, the number of repeats is 22–23 (Lu et al., 2015). Long polyglutamine tracts, specifically expansions longer than 34 CAG repeats at *ATXN2*, have been identified as the

* Corresponding author at: Department of Neurology, University of Campinas—UNICAMP, Cidade Universitaria “Zeferino Vaz”, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Campinas, SP 13083-887, Brazil. Tel./fax: +55 19 3521 9217.

E-mail address: mcfrancajr@uol.com.br (M.C. França).

cause of spinocerebellar ataxia type 2 (Pulst et al., 1996). Elden et al. (2010) found that the presence of intermediate-length CAG repeats (between 24 and 33) within the first exon of *ATXN2* was a possible risk factor for ALS in Caucasian populations. The Brazilian population is characterized by mixed ethnic origins that include not only Caucasians from European descent but also Amerindians, Asians, and people from African descent. The genetic profile of ALS in Brazil is indeed different from European and North American cohorts, with lower frequencies of *SOD1*- and *C9orf72*-related disease and higher frequencies of *VAPB* mutations (Chadi et al., 2017; Nishimura et al., 2004; Yamashita and Ando, 2015). Regarding *ATXN2*, there are no previous studies assessing its role in Brazilian or Latin American patients with ALS. Therefore, the aim of this study was to assess whether *ATXN2* intermediate alleles indeed confer an increased risk for ALS in our population and also to determine whether there is a specific clinical profile of *ATXN2*-related ALS in Brazil.

2. Methods

2.1. Subject selection

A total of 459 unrelated patients, including 372 SALS patients and 87 FALS patients and 468 neurologically normal control subjects, were included in this study. They were recruited between 2011 and 2017 from 6 neuromuscular/neurogenetic reference centers in Brazil: University of Campinas, University of Sao Paulo at Ribeirao Preto, Federal University of Minas Gerais, Federal University of São Paulo, Federal University of Santa Catarina, and Federal University of Rio Grande do Norte. ALS was diagnosed in each University Hospital by board-certified neurologists following revised El Escorial criteria (Brooks et al., 2000). Only patients that fulfilled criteria for definite or probable ALS were included.

We obtained data on age at disease onset and major phenotypic characteristics of the patients.

This study was approved by our institution Ethics Committee, and written informed consent was obtained from all participants.

2.2. Molecular studies

Genomic DNA was extracted from lymphocytes in peripheral blood following standard techniques (Sambrook and Green et al., 2012). We performed polymerase chain reactions (PCRs) to

determine the length of the normal and expanded alleles at exon 1 of the *ATXN2* gene. The final volume for each assay was 10 μ L: 50 ng of genomic DNA; 125 mM of each dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 2.5 pmol of each primer; Tris-HCl 20 mM; MgCl₂ 1.75 mM; KCl 50 mM; and 1.5 Units of TaqDNA polymerase (Fermentas—Thermo Fisher Scientific). We used the same primers and PCR conditions as described by Pulst et al. (1996); the forward primer was marked with the FAM fluorophore. PCR products were resolved using capillary electrophoresis on ABI 3500 \times 1 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The length of (CAG) repeats was then determined by comparison with standard markers (GeneScan 500 LIZ) using the GeneMapper software V4.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). To ascertain that CAG repeat lengths were correctly measured, we designed primers flanking exon 1 of *ATXN2* and sequenced the region in a subset of 15 samples. Estimated (CAG) repeat length was then compared using both methods.

2.3. Statistical analysis

We used descriptive statistics to characterize the demographic and clinical profile of all patients. Afterwards, we employed χ^2 test to compare the frequency of *ATXN2* intermediate expansions between ALS patients and controls. A logistic regression model was computed to determine the risk associated with the presence of this variant. Patients with intermediate expansions were then compared with those without expansions in terms of clinical and demographic parameters using Student's *t*-test. All analyses were performed on the SYSTAT v12.0 software and significance levels set at $p < 0.05$.

3. Results

Most subjects enrolled in this study (both patients and controls) were homozygous for 22 or 23 repeats or heterozygous for 22/23 repeats at the *ATXN2* gene (Fig. 1). *ATXN2* intermediate alleles (≥ 26) were detected in 29 patients (6.3%) and in 12 controls (2.56%) ($p = 0.005$). Mean CAG repeat length in patients and controls harboring intermediate alleles were 30 (range 26–34) and 28 (range 27–35). Logistic regression revealed that intermediate-length expansions (larger than 26 repeats) were associated with an increased risk for ALS (odds ratio = 2.56, 95% confidence interval: 1.29–5.08, $p = 0.005$).

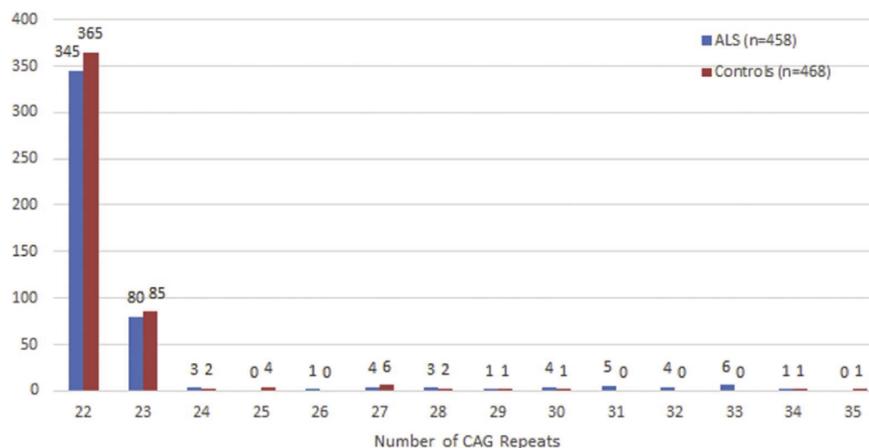


Fig. 1. Distribution of CAG repeats at *ATXN2* in ALS patients and healthy controls. Twenty-nine of 459 (6.3%) ALS patients and 12 of 468 (2.5%) control subjects presented 1 allele with intermediate-length CAG repeats. Abbreviation: ALS, amyotrophic lateral sclerosis.

Most patients with intermediate expansions presented classical ALS with combined upper and lower motor neuron involvement ($n = 20/29$). However, there were also phenotypes with predominant lower motor neuron ($n = 7$) or upper motor neuron ($n = 2$) involvement. One single patient presented associated dementia. Clinical ataxia was not identified in any patient. We then compared the clinical phenotype of patients with and without CAG expansions. In the *ATXN2*-positive group, there were 7 of 29 with positive family history (24.1%). In contrast, we identified 80/430 subjects with FALS in the *ATXN2*-negative subgroup (18.6%). The proportion of women in both ALS subgroups was similar ($48\% \times 39\%$, $p = 0.377$). Age at onset was also similar in both groups (*ATXN2*(+): 49.2 ± 12.5 versus *ATXN2*(-): 48.6 ± 13.6 , $p = 0.804$).

4. Discussion

In this study, we were able to show that *ATXN2* intermediate alleles are associated with an increased risk of developing ALS in our cohort of Brazilian patients. We strongly believe that this is a representative Brazilian sample because it included subjects from different regions in the country (northeastern, southeastern, and southern). From previous genetic surveys, it is clear that African ancestry is much more relevant in northeastern Brazil, whereas in the southern of the country there is higher Caucasian influence (Pena et al., 2009). In further studies, it would be important to check whether such association still holds true for subpopulations within the country stratified for ethnic genetic background.

This major finding is in line with previous reports from European and North American cohorts (Elden et al., 2010; Lee et al., 2011). Even the estimated risk increase ($2.56\times$) is similar to those reported previously (Neuenschwander et al., 2014; Wang et al., 2014). Similar to other reports (Narain et al., 2017; Sproviero et al., 2017), we failed to identify a specific phenotype in patients harboring *ATXN2*-intermediate expansions. There were subjects with classical ALS but also with predominant upper or lower motor neuron involvement. These data reinforce the pleiotropy associated to *ATXN2* expansions, which have also been related to parkinsonism and spinocerebellar ataxia type 2 (van Es et al., 2017). In future studies, the use of advanced tools (such as neuroimaging and other biomarkers) may be able to unravel subtle phenotypic differences between *ATXN2*-positive and *ATXN2*-negative patients.

Ataxin 2 plays an important role in the regulation of molecular processes like regulation of RNA stability and translation as well as repression of deleterious accumulation of the RNA-DNA hybrid-harboring R-loop structures (Ostrowski et al., 2017). In the context of ALS, it interacts with other ALS-linked gene products including C9ORF72, TDP-43, and FUS in a pathway dedicated to RNA metabolism inside neurons (Vucic et al., 2014). More recently, Becker et al. (2017) showed that lowering levels of ataxin 2 markedly increase lifespan and improve motor function in TDP-43 transgenic mice. This suggests that reduction of ataxin 2 has therapeutic potential for ALS and FTD. In a near future, it is possible that specific treatments for human *ATXN2*-related ALS appear, so that, knowledge of the genotypic status of each patient will be of paramount importance to guide therapy.

In conclusion, our results on a genetically mixed population from Latin America reinforce the role of *ATXN2*-intermediate alleles in the pathogenesis of ALS. Further studies are still needed to delineate in more detail the clinical and pathological phenotype of *ATXN2*-related ALS.

Disclosure statement

The authors report no conflict of interest regarding the current article.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESPs (grant #2013/01766-7) and Conselho Nacional de Pesquisa CNPq (grant # 470428/2011-2).

References

- Becker, L.A., Huang, B., Bieri, G., Ma, R., Knowles, D.A., Jafar-Nejad, P., Messing, J., Kim, H.J., Soriano, A., Auburger, G., Pulst, S.M., Taylor, J.P., Rigo, F., Gitler, A.D., 2017. Therapeutic reduction of ataxin-2 extends lifespan and reduces pathology in TDP-43 mice. *Nature* 20, 367–371.
- Brooks, B.R., Miller, R.G., Swash, M., Munsat, T.L. World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases, 2000. El escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral. Scler. Other. Motor. Neuron. Disord.* 1, 293–299.
- Cady, J., Allred, P., Bali, T., Pestronk, A., Goate, A., Miller, T.M., Mitra, R.D., Ravits, J., Harms, M.B., Baloh, R.H., 2015. ALS onset is influenced by the burden of rare variants in known ALS genes. *Ann. Neurol.* 77, 100–113.
- Chadi, G., Maximino, J.R., Jorge, F.M.H., Borba, F.C., Gillo, J.M., Callegaro, D., Lopes, C.G., Santos, S.N.D., Rebelo, G.N.S., 2017. Genetic analysis of patients with familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis in a Brazilian Research Center. *Amyotroph. Lateral. Scler. Frontotemporal Degener.* 18, 249–255.
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., Finch, N.A., Flynn, H., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G.Y., Karydas, A., Seeley, W.W., Josephs, K.A., Coppola, G., Geschwind, D.H., Wszolek, Z.K., Feldman, H., Knopman, D.S., Petersen, R.C., Miller, B.L., Dickson, D.W., Boylan, K.B., Graff-Radford, N.R., Rademakers, R., 2011. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72, 245–256.
- Elden, A.C., Kim, H.J., Hart, M.P., Chen-Plotkin, A.S., Johnson, B.S., Fang, X., Armakola, M., Geser, F., Greene, R., Lu, M.M., Padmanabhan, A., Clay-Falcone, D., McCluskey, L., Elman, L., Juh, D., Gruber, P.J., Rub, U., Auburger, G., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., Van Deerlin, V.M., Bonini, N.M., Gitler, A.D., 2010. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature* 466, 1069–1075.
- Highley, J.R., Lorente Pons, A., Cooper-Knock, J., Wharton, S.B., Ince, P.G., Shaw, P.J., Wood, J., Kirby, J., 2016. Motor neurone disease/amyotrophic lateral sclerosis associated with intermediate-length CAG repeat expansions in Ataxin-2 does not have 1C2-positive polyglutamine inclusions. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 42, 377–389.
- Imbert, G., Saudou, F., Yvert, G., Devys, D., Trottier, Y., Garnier, J.M., Weber, C., Mandel, J.L., Cancel, G., Abbas, N., Dürr, A., Didierjean, O., Stevanin, G., Agid, Y., Brice, A., 1996. Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nat. Genet.* 14, 285–291.
- Kwiatkowski Jr., T.J., Bosco, D.A., Leclerc, A.L., Tamrazian, E., Vanderburg, C.R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E.J., Munsat, T., Valdmanis, P., Rouleau, G.A., Hosler, B.A., Cortelli, P., de Jong, P.J., Yoshinaga, Y., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., Yan, J., Ticozzi, N., Siddique, T., McKenna-Yasek, D., Sapp, P.C., Horvitz, H.R., Landers, J.E., Brown Jr., R.H., 2009. Mutations in the FUS/TLN gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323, 1205–1208.
- Lastres-Becker, I., Rub, U., Auburger, G., 2008. Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2). *Cerebellum* 7, 115–124.
- Lee, T., Li, Y.R., Ingre, C., Weber, M., Grehl, T., Gredal, O., de Carvalho, M., Meyer, T., Tysnes, O.B., Auburger, G., Gispert, S., Bonini, N.M., Andersen, P.M., Gitler, A.D., 2011. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions in European ALS patients. *Hum. Mol. Genet.* 20, 1697–1700.
- Lu, H.P., Gan, S.R., Chen, S., Li, H.F., Liu, Z.J., Ni, W., Wang, N., Wu, Z.Y., 2015. Intermediate-length polyglutamine in *ATXN2* is a possible risk factor among Eastern Chinese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Aging* 36, 1603.e11–1603.e14.
- Narain, P., Gomes, J., Bhatia, R., Singh, I., Vivekanandan, P., 2017. C9orf72 hexanucleotide repeat expansions and Ataxin 2 intermediate length repeat expansions in Indian patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Aging* 56, 211.e9–211.e14.
- Neuenschwander, A.G., Thai, K.K., Figueroa, K.P., Pulst, S.M., 2014. Amyotrophic lateral sclerosis risk for spinocerebellar ataxia type 2 *ATXN2* CAG repeat alleles: a meta-analysis. *JAMA Neurol.* 71, 1529–1534.
- Neumann, M., Sampathu, D.M., Kwong, L.K., Truax, A.C., Micsenyi, M.C., Chou, T.T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C.M., McCluskey, L.F., Miller, B.L., Masliah, E., Mackenzie, I.R., Feldman, H., Feiden, W., Kretzschmar, H.A., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2006. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314, 130–133.
- Nishimura, A.L., Mitne-Neto, M., Silva, H.C., Richieri-Costa, A., Middleton, S., Cascio, D., Kok, F., Oliveira, J.R., Gillingwater, T., Webb, J., Skehel, P., Zatz, M., 2004. A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular. *Am. J. Hum. Genet.* 75, 822–831.
- Ostrowski, L.A., Hall, A.C., Mekhal, K., 2017. Ataxin-2: from RNA control to human health and disease. *Genes (Basel)* 8, 157.

ARTICLE IN PRESS

1e4

H.M. Tavares de Andrade et al. / *Neurobiology of Aging xxx (2018) 1e1–1e4*

- Pena, S.D., Bastos-Rodrigues, L., Pimenta, J.R., Bydlowski, S.P., 2009. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42, 870–876.
- Pulst, S.M., Nechiporuk, A., Nechiporuk, T., Gispert, S., Chen, X.N., Lopes-Cendes, I., Pearlman, S., Starkman, S., Orozco-Diaz, G., Lunke, A., DeJong, P., Rouleau, G.A., Auburger, G., Korenberg, J.R., Figueroa, C., Sahba, S., 1996. Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat. Genet.* 14, 269–276.
- Renton, A.E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J.R., Schymick, J.C., Laaksovirta, H., van Swieten, J.C., Myllykangas, L., Kalimo, H., Paetau, A., Abramzon, Y., Remes, A.M., Kaganovich, A., Scholz, S.W., Duckworth, J., Ding, J., Harmer, D.W., Hernandez, D.G., Johnson, J.O., Mok, K., Rytten, M., Trabzuni, D., Guerreiro, R.J., Orrell, R.W., Neal, J., Murray, A., Pearson, J., Jansen, I.E., Sondervan, D., Seelaar, H., Blake, D., Young, K., Halliwell, N., Callister, J.B., Toulson, G., Richardson, A., Gerhard, A., Snowden, J., Mann, D., Neary, D., Nalls, M.A., Peuralinna, T., Jansson, L., Isoviita, V.M., Kaivorinne, A.L., Hölttä-Vuori, M., Ikonen, E., Sulkava, R., Benatar, M., Wu, J., Chiò, A., Restagno, G., Borghero, G., Sabatelli, M., ITALSGEN Consortium, Heckerman, D., Rogava, E., Zinman, L., Rothstein, J.D., Sendtner, M., Drepper, C., Eichler, E.E., Alkan, C., Abdullaev, Z., Pack, S.D., Dutra, A., Pak, E., Hardy, J., Singleton, A., Williams, N.M., Heutink, P., Pickering-Brown, S., Morris, H.R., Tienari, P.J., Traynor, B.J., 2011. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 72, 257–268.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X., Rahmani, Z., Krizu, A., McKenna-Yasek, D., Cayabyab, A., Gaston, S.M., Berger, R., Tanzi, R.E., Halperin, J.J., Herzfeldt, B., Van Den Berg, R., Hung, W.Y., Bird, T., Deng, G., Mulder, D.W., Smyth, C., Laing, N.G., Soriano, E., Pericak-Vance, M.A., Haines, J., Rouleau, G.A., Gusella, J.S., Horvitz, H.R., Brown Jr., R.H., 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59–62.
- Sambrook, J., Green, M.R., 2012. Isolation and quantification of DNA. In: Sambrook, J., Green, M.R. (Eds.), *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 1–47. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Soong, B.W., Lin, K.P., Guo, Y.C., Lin, C.C., Tsai, P.C., Liao, Y.C., Lu, Y.C., Wang, S.J., Tsai, C.P., Lee, Y.C., 2014. Extensive molecular genetic survey of Taiwanese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Aging* 35, 2423.e1–2423.e6.
- Sproviero, W., Shatunov, A., Stahl, D., Shuai, M., van Rheenen, W., Jones, A.R., Al-Sarraj, S., Andersen, P.M., Bonini, N.M., Conforti, F.L., Van Damme, P., Daoud, H., Del Mar Amador, M., Fogh, I., Forzan, M., Gaastra, B., Gellera, C., Gitler, A.D., Hardy, J., Fratta, P., La Bella, V., Le Ber, I., Van Langenhove, T., Lattante, S., Lee, Y.C., Malaspina, A., Meininger, V., Millicamps, S., Orrell, R., Rademakers, R., Robberecht, W., Rouleau, G., Ross, O.A., Salachas, F., Sidle, K., Smith, B.N., Soong, B.W., Sorarù, G., Stevanin, G., Kabashi, E., Troakes, C., van Broeckhoven, C., Veldink, J., van den Berg, L.H., Shaw, C.E., Powell, J.F., Al-Chalabi, A., 2017. ATXN2 trinucleotide repeat length correlates with risk of ALS. *Neurobiol. Aging* 51, 178.e1–178.e9.
- van Es, M.A., Hardiman, O., Chio, A., Al-Chalabi, A., Pasterkamp, R.J., Veldink, J.H., van den Berg, L.H., 2017. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 390, 2084–2098.
- Vance, C., Rogelj, B., Hortobágyi, T., De Vos, K.J., Nishimura, A.L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., Ganesalingam, J., Williams, K.L., Tripathi, V., Al-Saraj, S., Al-Chalabi, A., Leigh, P.N., Blair, I.P., Nicholson, G., de Bellerocche, J., Gallo, J.M., Miller, C.C., Shaw, C.E., 2009. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 323, 1208–1211.
- Vucic, S., Rothstein, J.D., Kiernan, M.C., 2014. Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: insights from pathophysiological studies. *Trends Neurosci.* 37, 433–442.
- Wang, M.D., Gomes, J., Cashman, N.R., Little, J., Krewski, D., 2014. Intermediate CAG repeat expansion in the ATXN2 gene is a unique genetic risk factor for ALS—a systematic review and meta-analysis of observational studies. *PLoS One* 9, e105534.
- Yamashita, S., Ando, Y., 2015. Genotype-phenotype relationship in hereditary amyotrophic lateral sclerosis. *Transl. Neurodegener.* 4, 4–13.

5 - Discussão Geral

Apesar do grande progresso obtido no conhecimento da fisiopatologia e da genética da ELA nos últimos anos, esta continua sendo uma doença desafiadora devido à falta de conhecimento preciso acerca de sua etiologia com consequente dificuldade diagnóstica, prognóstica e sobretudo terapêutica.

Em nosso trabalho procuramos explorar ferramentas de genética molecular, com o intuito de esclarecer aspectos relevantes sobre o ELA, especialmente no contexto brasileiro. Em particular, tentamos contribuir com o diagnóstico e prognóstico utilizando miRNAs e com a etiologia ao verificar se o gene *ATXN2* é fator de risco para ELA no Brasil.

ELA e miRNAs

Os miRNAs do músculo esquelético foram os miRNAs de escolha de nosso estudo tendo em vista que o músculo é o órgão que sofre o dano final na doença e é o mais afetado durante a degeneração, sendo sua atrofia causa direta de déficit motor. Os miRNA musculares são liberados diretamente na corrente sanguínea o que facilita sua identificação e quantificação, enquanto que os miRNAs do SNC têm o impedimento da barreira hematoencefálica o que dificultaria sua análise. O tecido muscular também tem a vantagem de ser de fácil acesso para biópsia, o que nos permitiu ter o parâmetro de quais miRNAs alvos estavam aumentados no tecido, enquanto que para SNC a biópsia é praticamente impeditiva.

No estudo de miRNAs, foram encontrados 11 miRNAs diferencialmente expressos em amostras de músculo, sendo que o miRNA 424 também estava hiperexpresso no plasma. O miRNA 206 apresentou maior expressão no tecido muscular no grupo de pacientes com ELA, mas não apresentou significância estatística à correção FDR. Apesar disto, estudamos o miRNA 206 no plasma devido aos relatos prévios na literatura (124) e encontramos aumento significativo do miRNA 206 no plasma.

O miRNA 206 é um miRNA específico de músculo esquelético em humanos que influencia a formação de novas junções neuromusculares após uma lesão nervosa e, portanto, desempenha um papel importante na reinervação de músculos

desnervados (134). A expressão do miRNA 206 é controlada por fatores de transcrição miogênicos regulatórios incluindo myogenina e MyoD que também estão hiperexpressos na desnervação (124). Em ratos transgênicos SOD1 G93A nocauteados para o gene miRNA 206, houve atraso e incompleta reinervação muscular em comparação com os animais que expressaram miRNA 206 (134). Esses resultados experimentais sugerem que a hiperexpressão de miRNA 206 pode ser protetora contra a doença. Em concordância com estes dados, nossos resultados mostraram que níveis plasmáticos mais elevados deste miRNA na primeira visita foram preditores de deterioração clínica mais lenta ao longo de 12 meses.

O miRNA 206 apresentou-se hiperexpresso tanto no plasma como no músculo esquelético dos pacientes com ELA, mas a hiperexpressão não foi progressiva em 6 e 12 meses de acompanhamento. Embora possa parecer contra-intuitivo, acreditamos que isso pode ser explicado pelo comportamento da expressão do miRNA 206 durante o curso da doença. É provável que o miRNA 206 aumente no início da doença, atinja um platô e depois comecasse a cair. Isso ocorreria paralelamente à perda de músculo esquelético durante a doença, tecido em que o miRNA 206 é fundamentalmente expresso. Esta hipótese é apoiada por dados experimentais de Toivonen et al. (124) que encontraram um aumento progressivo na expressão plasmática do miRNA 206 em camundongos transgênicos G93A-SOD1 até 120 dias de vida e seguido de queda dos níveis na fase terminal da doença.

Ao observar cuidadosamente o perfil clínico da coorte, na primeira visita, verificou-se que havia pacientes com doença grave e de longa duração e pacientes recentemente diagnosticados com poucos sintomas. É possível que a reunião de todos estes sujeitos para análises longitudinais possa ter influenciado os resultados. Apesar de não significativo, os dados sugerem que a expressão plasmática de miR 206 é maior no grupo menos acometido/inicial, e menor no grupo mais acometido/terminal.

Quanto ao miRNA 424, ambos os grupos tiveram valores aumentados, mas no grupo menos acometido os níveis foram quase 3 vezes maiores do que no grupo mais acometido. O miRNA 424 estava hiperexpresso no plasma e no músculo esquelético de pacientes com ELA. Os níveis plasmáticos, na primeira visita, também se correlacionaram inversamente com a progressão da doença. Existem poucos estudos que implicaram este miRNA em doenças neurológicas, mas nenhum na ELA (135,136,137,138,139). Análises *in silico* forneceram informações interessantes sobre

o possível papel de miRNA 424 em ELA, o que pode gerar hipóteses a serem testadas em estudos futuros. Usando diferentes bancos de dados e algoritmos de predição, identificamos um conjunto de genes que são alvos prováveis para este miRNA. Estes incluem genes envolvidos com transporte axonal de neurônios motores (*KIF1b*) e genes que codificam várias proteínas sarcolemais e sarcoméricas (*TPM2*, *MYL1*, *MYH7B*). Recentemente, o gene alvo *TPM2* foi validado em experimentos que empregaram uma abordagem baseada em Sequenciamento de Nova Geração (140). No entanto, o candidato mais promissor é o gene *VAPB*; mutações neste gene causam ELA familiar tipo 8. Usando três softwares diferentes (RNHybrid, miRdb e MIRgen), identificamos uma região de ligação para miRNA 424 na região 3'UTR do gene *VAPB*. Esses resultados sugerem que miRNA424 pode reduzir a expressão da *VAPB*, fenômeno semelhante ao que ocorreria em pacientes com ELA tipo 8 (141).

Os achados que correlacionam os níveis plasmáticos de miRNA e deterioração clínica em pacientes com ELA são especialmente relevantes, já que os dados mais significativos foram encontrados com o escore MRC que é uma medida direta da força dos pacientes (mais relacionado à integridade do neurônio motor), e não com ALSFRS e ALSSS, que são escalas funcionais. Portanto, é razoável assumir que realmente o escore MRC se correlaciona melhor com o nível de expressão dos miRNAs do músculo esquelético. Assim, parece que ambos os miRNA 424 e miRNA 206 são marcadores confiáveis de neurônio motor inferior/ dano muscular esquelético em pacientes com ELA. Talvez, a quantificação destes miRNAs permita o reconhecimento mais precoce de lesão do neurônio motor inferior nesses pacientes e possa ser um marcador prognóstico, visto que sua maior expressão no início da doença parece ser protetora. Assim, seria possível determinar quais pacientes teriam evolução mais lenta.

ELA e o gene *ATXN2*

No estudo do gene *ATXN2*, houve associação entre os alelos intermediários *ATXN2* e risco aumentado de desenvolver ELA na coorte de pacientes brasileiros. Esta é uma amostra brasileira representativa porque incluiu sujeitos de diferentes regiões do país (nordeste, sudeste e sul). Estudos genéticos anteriores, mostram que a ascendência africana é muito mais relevante no Nordeste do Brasil, enquanto que

no sul do país há maior influência caucasiana (125). Portanto, a inclusão de pacientes com origens distintas torna o estudo mais fidedigno ao perfil da população brasileira.

Estes dados estão de acordo com estudos anteriores de coortes europeias e norte-americanas (57,142). O risco estimado (2,56x) foi semelhante aos relatos anteriores (143, 144). Do mesmo modo que em outros levantamentos, não foi possível identificar um fenótipo específico em pacientes portadores de expansões intermediárias *ATXN2* (145,146). Havia indivíduos com ELA clássica, com envolvimento predominante do neurônio motor superior e com envolvimento predominante do neurônio motor inferior. Esses dados reforçam a pleiotropia associada às expansões *ATXN2*, que também são relacionadas ao parkinsonismo e a SCA2 (147).

A ataxina 2 desempenha um papel importante na regulação de processos moleculares como o controle da estabilidade e tradução do RNA, bem como a repressão do acúmulo deletério do RNA-DNA híbrido que abriga as estruturas R *loop* (148). No contexto da ELA, ela interage com outros produtos de genes ligados à doença incluindo *C9orf72*, *TDP-43* e *FUS* em uma via dedicada ao metabolismo de RNA dentro dos neurônios (149). Mais recentemente, Becker et al. (150) mostraram que a redução dos níveis de ataxina 2 aumenta a sobrevida e melhora a função motora em camundongos transgênicos *TDP-43*. Isso sugere que a redução da ataxina 2 tem potencial terapêutico para ELA e Demência Frontotemporal. Em um futuro próximo, é possível que surjam tratamentos específicos para ELA relacionados com *ATXN2* humano, de modo que o conhecimento do estado genotípico de cada paciente será de suma importância para orientar a terapia

6 - Conclusão

As principais conclusões de nossos estudos foram:

ELA x miRNAS:

1. Encontramos 10 microRNAs hiperexpressos (miR-424, miR-503, miR-886-3p, miR-542-5p, miR-34a, miR-886-5p, miR-146b-5p, miR-21, miR-214 e miR-183) no músculo esquelético de pacientes com ELA e um microRNA hipoexpresso (miR-504)
2. O miR-424 e o miR-206 também estavam hiperexpressos no plasma dos pacientes
3. Os níveis plasmáticos dos miR-424 e miR-206 correlacionaram-se inversamente com a deterioração da doença no seguimento clínico por um ano

ELA x gene *ATXN2*:

1. A presença do alelo intermediário *ATXN2* aumentou o risco de desenvolver ELA em 2,5 vezes em pacientes brasileiros
2. Não houve diferença de fenótipo entre os pacientes com e sem a expansão

7 - Referências

1. Luna J, Logroscino G, Couratier P, Marin B. Current issues in ALS epidemiology: Variation of ALS occurrence between populations and physical activity as a risk factor. *Revue Neurologique*. 2017; 173: 244– 3
2. Martin S, Khleifat A, Al-Chalabi A. What causes amyotrophic lateral sclerosis? *F1000Research* 2017; 6(F1000 Faculty Rev):371:1-10
3. Chiò A, Logroscino G, Traynor BJ, Collins J, Simeone JC, Goldstein LA, et al. Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology*.2013; 41: 118–30.
4. Mitchell JD, Callagher P, Gardham J, Mitchell C, Dixon M, Addison-Jones R et al. Timelines in the diagnostic evaluation of people with suspected amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND)--a 20-year review: can we do better? *Amyotroph Lateral Scler*. 2010; 11(6): 537–41.
5. Lonergan R, Mistumoto H, Murray B. Amyotrophic Lateral Sclerosis. In Katirji B, Kaminski HJ, Ruff RL, editors. *Neuromuscular Disorders in Clinical Practice*. Second Edition. Washington: Springer; 2014. p.395-423.
6. Al-Chalabi A, van den Berg LH, Veldink J. Gene discovery in amyotrophic lateral sclerosis: implications for clinical management. *Nat Rev Neurol*. 2017;13:96-104.
7. Tard C, Defebvre L, Moreau C, Devos D, Danel-Brunaud V. Clinical features of amyotrophic lateral sclerosis and their prognostic value. *Rev Neurol*. 2017;173:263-72.
8. Ferguson TA, Elman LB. Clinical presentation and diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *NeuroRehabilitation* 2007; 22:409–16.
9. Ramirez C, Piemonte MEP, Callegaro D, Da Silva HCA. Fatigue in amyotrophic lateral sclerosis: frequency and associated factors. *Amyotroph Lateral Scler*. 2008; :75–80.
10. Corcia P, Petiot P, Stevic Z, Vourc'h P, Morales R, Gordon, PH, et al. Respiratory onset in an ALS family with L144F SOD1 mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.2011; 82:747–9.
11. Gautier G, Verschueren A, Monnier A, Attarian S, Salort- Campana E, Pouget J. ALS with respiratory onset: clinical features and effects of non-invasive ventilation on the prognosis. *Amyotroph Lateral Scler*. 2010;11:379–82.

12. Gordon PH, Cheng B, Katz IB, Pinto M, Hays AP, Mitsumoto H, Rowland LP. The natural history of primary lateral sclerosis. *Neurology*. 2006; 14 66:647–53.
13. Tartaglia MC, Rowe A, Findlater K, Orange JB, Grace G, Strong MJ. Differentiation between primary lateral sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis: examination of symptoms and signs at disease onset and during follow-up. *Arch Neurol*. 2007;64:232–6.
14. Geser F, Stein B, Partain M, Elman LB, McCluskey LF, Xie SX. Motor neuron disease clinically limited to the lower motor neuron is a diffuse TDP-43 proteinopathy. *Acta Neuropathol*. 2011;121:509–17.
15. Wijesekera LC, Mathers S, Talman P, Galtrey C, Parkinson MH, Ganesalingam J, et al. Natural history and clinical features of the flail arm and flail leg ALS variants. *Neurology* 2009;72 :1087–94.
16. Hu MT, Ellis CM, Al-Chalabi A, Leigh PN, Shaw CE. Flail arm syndrome: a distinctive variant of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998; 65:950–1.
17. Gamez J, Cervera C, Codina A. Flail arm syndrome or Vulpian-Bernhart's form of amyotrophic lateral sclerosis? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999;67(2):258.
18. Katz JS, Wolfe GI, Andersson PB, Saperstein DS, Elliott JL, Nations SP, et al. Brachial amyotrophic diplegia: a slowly progressive motor neuron disorder. *Neurology*. 1999;53:1071–6.
19. Cappellari A, Ciammola A, Silani V. The pseudopolyneuritic form of amyotrophic lateral sclerosis (Patrikios' disease). *Electromyogr Clin Neurophysiol* 2008;4:75–81.
20. Sobue I, Saito N, Iida M, Ando K. Juvenile type of distal and segmental muscular atrophy of upper extremities. *Ann Neurol* 1978;3:429–432.
21. Duffy JR, Peach RK, Strand EA. Progressive apraxia of speech as a sign of motor neuron disease. *Am J Speech Lang Pathol*. 2007;16 (3):198–208.
22. Leigh PN, Abrahams S, Al-Chalabi A, Ampong M-A, Goldstein LH, Johnson J, et al. The management of motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003;74(Suppl. 4):iv32–47.
23. Korner S, Kollwe K, Fahlbusch M, Zapf A, Dengler R, Krampfl K, et al. Onset and spreading patterns of upper and lower motor neuron symptoms in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 2011;43:636–42.

24. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006; 314: 130–3.
25. Branco LMT, de Rezende TJR, Roversi CO, Zanao T, Casseb RF, de Campos BM et al. Brain signature of mild stages of cognitive and behavioral impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Psychiatry Res.* 2018; 28:58-64.
26. Chen S, Sayana P, Zhang X, Le W. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Mol Neurodegener* 2013;8:28.
27. Yamashita S and Ando Y. Genotype-phenotype relationship in hereditary amyotrophic lateral sclerosis. *Transl Neurodegener.* 2015; 24: 4:13.
28. Camu W, Khoris J, Moulard B, Salachas F, Briolotti V, Rouleau GA, et al. Genetics of familial ALS and consequences for diagnosis. French ALS Research Group. *J Neurol Sci* 1999;165(Suppl 1):S21–6.
29. Corcia P, Couratier P, H. Blasco H, Andres CR , Beltran S ,Meininger V et al. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Rev Neurol.* 2017;173: 254–262.
30. Renton AE, Chiò A, Traynor BJ. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci.* 2014;17:17–23.
31. van Rheenen W, Shatunov A, Dekker AM, McLaughlin RL, Diekstra FP, Pulit SL, et al. Genome-wide association analyses identify new risk variants and the genetic architecture of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet.* 2016;48:1043–8.
32. Valdmanis PN, Daoud H, Dion PA, Rouleau GA. Recent advances in the genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2009;9:198–205.
33. Fecto F, Yan J, Vemula SP, Liu E, Yang Y, Chen W, et al. SQSTM1 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.* 2011;68:1440–46.
34. Cirulli ET, Lasseigne BN, Petrovski S, Sapp PC, Dion PA, Leblond CS, et al. Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science.* 2015; 347: 1436–41.
35. Ostrowski LA, Hall AC, Mekhail K. Ataxin-2: From RNA Control to Human Health and Disease. *Genes (Basel).* 2017; 8:1-21.

36. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 1993;362:59–62.
37. Corcia P, Valdmanis P, Millicamps S, Lionnet C, Blasco H, Mouzat K, et al. Phenotype and genotype analysis in amyotrophic lateral sclerosis with TARDBP gene mutations. *Neurology*. 2012;78:1519–26.
38. Kwiatkowski TJ, Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2009;323:1205–8.
39. Valdmanis PN, Daoud H, Dion PA, Rouleau GA. Recent advances in the genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2009;9:198–205.
40. Dormann D, Rodde R, Edbauer D, Bentmann E, Fischer I, Hruscha A et al. ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import. *EMBO J*. 2010;29: 2841-57.
41. Conte A, Lattante S, Zollino M, Marangi G, Luigetti M, Del Grande A, et al. P525L FUS mutation is consistently associated with a severe form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromuscul Disord*. 2012;22:73–5.
42. Vance C, Rogelj B, Hortobágyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 2009;323:1208–11.
43. Lattante S, Rouleau GA, Kabashi E. TARDBP and FUS mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis: summary and update. *Hum Mutat*. 2013;34:812–26.
44. Nishimura AL, Mitne-Neto M, Silva HC, Richieri-Costa A, Middleton S, Cascio D, et al. A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet*. 2004;75:822–31.
45. Marques VD, Barreira AA, Davis MB, Abou-Sleiman PM, Silva Jr WA, Zago MA, et al. Expanding the phenotypes of the Pro56Ser VAPB mutation: proximal SMA with dysautonomia. *Muscle Nerve*. 2006;34:731–9.
46. Cintra VP, Bonadia LC, Andrade HMT, de Albuquerque M, Eusébio MF, de Oliveira DS et al. The frequency of the C9orf72 expansion in a Brazilian population. *Neurobiol Aging*. 2018; 31: pii: S0197-4580(18)30015-0.

47. Chi S, Jiang T, Tan L, Yu J-T. Distinct neurological disorders with C9orf72 mutations: genetics, pathogenesis, and therapy. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016;66:127–42.
48. Majounie E, Renton AE, Mok K, Dopper EGP, Waite A, Rollinson S, et al. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol*. 2012;11:323–30.
49. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*. 2011;72:245-56.
50. Rutherford NJ, Heckman MG, Dejesus-Hernandez M, Baker MC, Soto-Ortolaza AI, Rayaprolu S et al. Length of normal alleles of C9ORF72 GGGGCC repeat do not influence disease phenotype. *Neurobiol Aging*. 2012;33: e5-7.
51. Cooper-Knock J, Kirby J, Highley R, Shaw PJ. The spectrum of C9orf72-mediated neurodegeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2015;12:326–39.
52. Whitwell JL, Weigand SD, Boeve BF, Senjem ML, Gunter JL, DeJesus-Hernandez M, et al. Neuroimaging signatures of frontotemporal dementia genetics: C9ORF72, tau, progranulin and sporadics. *Brain*. 2012;135:794–806.
53. Lastres-Becker I, Rub U, Auburger G., Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2). *Cerebellum*. 2008;7:115-24.
54. Imbert G, Saudou F, Yvert G, Devys D, Trottier Y, Garnier JM et al. Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nat Genet*. 1996;14:285-91.
55. Lu HP, Gan SR, Chen S, Li HF, Liu ZJ, Ni W, et al. Intermediate-length polyglutamine in ATXN2 is a possible risk factor among Eastern Chinese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*. 2015;36:1603.e11-4.
56. Pulst SM, Nechiporuk A, Nechiporuk T, Gispert S, Chen XN, Lopes-Cendes I et al. Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat Genet*. 1996;14:269-76
57. Elden AC, Kim HJ, Hart MP, Chen-Plotkin AS, Johnson BS, Fang X et al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature*. 2010;466(7310):1069-75

58. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2006;314(5796):130-3.
59. Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H et al. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;351:602-11.
60. Soong BW, Lin KP, Guo YC, Lin CC, Tsai PC, Liao YC et al. Extensive molecular genetic survey of Taiwanese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*. 2014;35:2423.e1-6.
61. Chiò A, Mora G, Sabatelli M, Caponnetto C, Lunetta C, Traynor BJ et al. ATNX2 is not a regulatory gene in Italian amyotrophic lateral sclerosis patients with C9ORF72 GGGGCC expansion. *Neurobiol Aging*. 2016;39:218.e5-8.
62. Lenglet T, Camdessanché JP. Amyotrophic lateral sclerosis or not: Keys for the diagnosis. *Rev Neurol*. 2017;173:280-87.
63. Brooks BR. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. *J Neurol Sci* 1994;124(Suppl.):96–107.
64. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2000;1:293–9.
65. Aggarwal S, Cudkowicz M. ALS drug development: reflections from the past and a way forward. *Neurotherapeutics* 2008;5:516–27.
66. de Carvalho M, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J, et al. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clin Neurophysiol* 2008;119:497–503.
67. de Carvalho M, Swash M. Fasciculation potentials and earliest changes in motor unit physiology in ALS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013;84:963–8.

68. Douglass CP, Kandler RH, Shaw PJ, McDermott CJ. An evaluation of neurophysiological criteria used in the diagnosis of motor neuron disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81:646–9.
69. Schrooten M, Smetcoren C, Robberecht W, Van Damme P. Benefit of the Awaji diagnostic algorithm for amyotrophic lateral sclerosis: a prospective study. *Ann Neurol* 2011;70:79–83.
70. Geevasinga N, Loy CT, Menon P, de Carvalho M, Swash M, Schrooten M, et al. Awaji criteria improves the diagnostic sensitivity in amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review using individual patient data. *Clin Neurophysiol* 2016;127:2684–91.
71. Costa J, Swash M, de Carvalho M. Awaji criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *Arch Neurol* 2012;69:1410–6.
72. Noto Y, Misawa S, Kanai K, Shibuya K, Iose S, Nasu S, et al. Awaji ALS criteria increase the diagnostic sensitivity in patients with bulbar onset. *Clin Neurophysiol* 2012;123: 382–5.
73. Bresch S, Delmont E, Soriani M-H, Desnuelle C. Electrodiagnostic criteria for early diagnosis of bulbaronset ALS: a comparison of El Escorial, revised El Escorial and Awaji algorithm. *Rev Neurol (Paris)*. 2014;170:134-9.
74. Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chio' A, Couratier P, Mitchell JD, et al. Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: new evidence and unsolved issues. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79:6–11.
75. Rutter-Locher Z, Turner MR, Leigh PN, Al-Chalabi A. Analysis of terms used for the diagnosis and classification of amyotrophic lateral sclerosis and motor neuron disease. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener*. 2016;17:600–4.
76. Riku Y, Atsuta N, Yoshida M, Tatsumi S, Iwasaki Y, Mimuro M, et al. Differential motor neuron involvement in progressive muscular atrophy: a comparative study with amyotrophic lateral sclerosis. *BMJ Open* 2014;4:e005213.
77. Al-Chalabi A, Hardiman O, Kiernan MC, Chiò A, Rix-Brooks B, van den Berg LH. Amyotrophic lateral sclerosis: moving towards a new classification system. *Lancet Neurol*. 2016;15:1182-94.
78. Vu L, Bowser R. Fluid-Based Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2017; 14:119–34.

79. Turner MR, Kiernan MC, Leigh PN, Talbot K. Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol*. 2009; 8(1):94-109.
80. Brettschneider J, Petzold A, Sussmuth SD, Ludolph AC, Tumani H. Axonal damage markers in cerebrospinal fluid are increased in ALS. *Neurology* 2006;66:852-56.
81. Reijn TS, Abdo WF, Schelhaas HJ, Verbeek MM. CSF neurofilament protein analysis in the differential diagnosis of ALS. *J Neurol* 2009;256:615-19.
82. Ganesalingam J, An J, Shaw CE, Shaw G, Lacomis D, Bowser R. Combination of neurofilament heavy chain and complement C3 as CSF biomarkers for ALS. *J Neurochem* 2011;117:528-37.
83. Boylan K, Yang C, Crook J, Overstreet K, Heckman M, Wang Y et al. Immunoreactivity of the phosphorylated axonal neurofilament H subunit (pNF-H) in blood of ALS model rodents and ALS patients: evaluation of blood pNF-H as a potential ALS biomarker. *J Neurochem* 2009;111(5):1182-91.
84. Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science* 2016;353:777-83.
85. McGeer PL, McGeer EG. Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 2002;26:459-70.
86. Ehrhart J, Smith AJ, Kuzmin-Nichols N, Zesiewicz TA, Jahan I, Shytle RD et al. Humoral factors in ALS patients during disease progression. *J Neuroinflammation* 2015;12:127.
87. Houi K, Kobayashi T, Kato S, Mochio S, Inoue K. Increased plasma TGF-beta1 in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2002;106:299-301.
88. King AE, Woodhouse A, Kirkcaldie MTK, Vickers JC. Excitotoxicity in ALS: overstimulation, or overreaction? *Exp Neurol* 2016;275:162-71.
89. Blasco H, Mavel S, Corcia P, Gordon PH. The glutamate hypothesis in ALS: pathophysiology and drug development. *Curr Med Chem* 2014;21:3551-75.
90. Turner MR, Bowser R, Bruijn L, Dupuis L, Ludolph A, McGrath M et al. Mechanisms, models and biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 2013;14(Suppl. 1):19-32.
91. Tsuji-Akimoto S, Yabe I, Niino M, Kikuchi S, Sasaki H. Cystatin C in cerebrospinal fluid as a biomarker of ALS. *Neurosci Lett* 2009;452:52-55.

92. Wilson ME, Boumaza I, Lacomis D, Bowser R. Cystatin C: A candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *PLOS ONE* 2010;5: e15133.
93. Wilson ME, Boumaza I, Bowser R. Measurement of cystatin C functional activity in the cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis and control subjects. *Fluids Barriers CNS* 2013;10:15.
94. Quinlan S, Kenny A, Medina M, Engel T, Jimenez-Mateos EM. MicroRNAs in Neurodegenerative Diseases. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2017;334:309-343.
95. Hossain MM, Sohel MMH., Schellander, K., Tesfaye, D. Characterization and importance of microRNAs in mammalian gonadal functions. *Cell Tissue Res* 2012; 349: 679–690.
96. Sohel MH. Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. *Achievements in the Life Sciences* 2016;10: 175–186.
97. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009;19 :92–105.
98. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 2011;12:99–110.
99. Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell.* 2001; 107(7):823-6.
100. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993; 75:843-54.
101. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000; 403:901-6.
102. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature.* 2000; 408:86-9.
103. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 2001; 294(5543):853-8.
104. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA.* 2003; 9:277-9.
105. Mattick JS, Makunin IV. Small regulatory RNAs in mammals. *Hum Mol Genet.* 2005; 14 Spec No 1:R121-32.

106. Kim VN .MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6:376-85
107. Barbato C, Giori C, Catalanotto C, Cogoni C. Thinking about RNA? MicroRNAs in the brain. *Mamm Genome.* 2008; 19:541-51.
108. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J et al. The nuclear Rnase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* 2003; 425:415-19.
109. Erson AE, Petty EM. MicroRNAs in development and disease. *Clinical Genetics.* 2008; 74:296-306.
110. Schrott G. MicroRNAs at the synapse. *Nat Rev Neurosci.* 2009 Dec;10:842-9
111. Song J, Bai Z, Han W, Zhang J, Meng H, Bi J, Ma X, et al. Identification of Suitable Reference Genes for qPCR Analysis of Serum microRNA in Gastric Cancer Patients. *Dig Dis Sci.* 2012;57:897-904.
112. Wei J, Gao W, Zhu CJ, Liu YQ, Mei Z, Cheng T, et al. Identification of plasma microRNA-21 as a biomarker for early detection and chemosensitivity of non-small cell lung cancer. *Chin J Cancer.* 2011;30:407-14.
113. Yamada Y, Enokida H, Kojima S, Kawakami K, Chiyomaru T, Tatarano S, et al. MiR- 96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology. *Cancer Sci.* 2011;102:522-9.
114. Turchinovich A, Samatov TR, Tonevitsky AG, Burwinkel B. Circulating miRNAs: cell-cell communication function? *Front Genet.* 2013 Jun 28;4:119.
115. Guay C and Regazzi R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2013 Sep;9:513-21.
116. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105:10513-18.
117. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* 2008;10:1470-6.
118. Geekiyanage H, Chan C. MicroRNA-137/181c regulates serine palmitoyltransferase and in turn amyloid β , novel targets in sporadic Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2011; 12(31):14820-30.

119. Serafin A, Foco L, Zanigni S, Blankenburg H, Picard A, Zanon A, et al. Overexpression of blood microRNAs 103a, 30b, and 29a in L-dopa-treated patients with PD. *Neurology*. 2015;17:645-53.
120. Gandhi R, Healy B, Gholipour T, Egorova S, Musallam A, Hussain MS, Nejad P et al. Circulating microRNAs as biomarkers for disease staging in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2013;;73:729-40.
121. Lee ST, Chu K, Im WS, Yoon HJ, Im JY, Park JE et al. Altered microRNA regulation in Huntington's disease models. *Exp Neurol*. 2011; 227:172-9.
122. Ubhi K, Rockenstein E, Kragh C, Inglis C, Spencer B, Michael S et al. Widespread microRNA dysregulation in multiple system atrophy - disease-related alteration in miR-96. *Eur J Neurosci*. 2014; 39:1026-41.
123. De Felice B, Annunziata A, Fiorentino G, Borra M, Biffali E, Coppola C et al. miR-338-3p is over-expressed in blood, CFS, serum and spinal cord from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurogenetics*. 2014;15:243-53.
124. Toivonen JM, Manzano R, Oliván S, Zaragoza P, Garcia-Redondo A, Osta R. MicroRNA-206: a potential circulating biomarker candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *Plos One*. 2014;9: 1–13.
125. Pena SD, Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Bydlowski SP. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. *Braz J Med Biol Res*. 2009;42:870-6.
126. Chadi G, Maximino JR, Jorge FMH, Borba FC, Gilio JM, Callegaro D et al. Genetic analysis of patients with familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis in a Brazilian Research Center. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2017;18:249-55.
127. Dietrich-Neto F, Callegaro D, Dias-Tosta E, Silva HA, Ferraz ME, Lima JM et al. Amyotrophic lateral sclerosis in Brazil: 1998 national survey. *Arq Neuropsiquiatr*. 2000;58:607-15
128. Cedarbaum JM, Stambler N, Malta E, Fuller C, Hilt D, Thurmond B et al. The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. BDNF ALS Study Group (phase III). *J Neurol Sci* 1999;169:13–21.
129. A.D. Hillel, R.M. Miller, K. Yorkston, E. McDonald, F.H. Norris, N. Konikow. Amyotrophic lateral sclerosis severity scale. *Neuroepidemiology*. 1989;8:142-50.

130. Alexiou P, Vergoulis T, Gleditsch M, Prekas G, Dalamagas T, Megraw M, et al. miRGen 2.0: a database of microRNA genomic information and regulation. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:D137-41.
131. Krüger J, Rehmsmeier M. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Res.* 2006;1:W451-4.
132. Sambrook J, Green MR. Isolation and Quantification of DNA. In: Sambrook J, Green MR, editors. *Molecular Cloning*. New York. Cold Spring Harbor; 2012.p 1-47.
133. de Andrade HM, de Albuquerque M, Avansini SH, de S Rocha C, Dogini DB, Nucci A, et al. MicroRNAs-424 and 206 are potential prognostic markers in spinal onset amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 2016; 15 (368):19-24.
134. De Felice B, Guida M, Coppola C, De Mieri G., Cotrufo R. A miRNA signature in leukocytes from sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Gene.* 2012; 508: 35–40.
135. Alvarez-Mora MI, Rodriguez-Revenga L, Madrigal I, Torres-Silva F, Mateu-Huertas E, Lizano E, et al., MicroRNA expression profiling in blood from fragile X-associated tremor/ataxia syndrome patients, *Genes Brain Behav.* 2013;12: 595–603.
136. Yang L, J Wang J, Sun X, Cao Y, Ning S, Zhang H, et al., Identifying a polymorphic 'switch' that influences miRNAs' regulation of a myasthenia gravis risk pathway. *PLoS One.* 2014; 12:e104827
137. Wang WX, Huang Q, Hu Y, Stromberg AJ, Nelson PT. Patterns of microRNA expression in normal and early Alzheimer's disease human temporal cortex: white matter versus gray matter, *Acta Neuropathol.* 2011;121:193–205.
138. Kunze K, Gamerding U, Leßig-Owlanj UJ, Sorokina M, Brobeil A, Tur MK, et al. Detection of an activated JAK3 variant and a Xq26.3 microdeletion causing loss of PHF6 and miR-424 expression in myelodysplastic syndromes by combined targeted next generation sequencing and SNP array analysis. *Pathol. Res. Pract.* 2014; 210: 369–76.
139. Zhao H, Wang J, Gao L, Wang R, Liu X, Gao Z, et al., MiRNA-424 protects against permanent focal cerebral ischemia injury in mice involving suppressing microglia activation, *Stroke.* 2013; 44: 1706–13.

140. Whisnant AW, Bogerd HP, Flores O, Ho P, Powers JG, Sharova N, et al. In-depth analysis of the interaction of HIV-1 with cellular microRNA biogenesis and effector mechanisms, *MBio*. 2013; 4: e000193.
141. Kabashi E, Oussini H, Bercier V, Gros-Louis F, Valdmanis PN, McDearmid J, et al., Investigating the contribution of VAPB/ALS8 loss of function in amyotrophic lateral sclerosis, *Hum. Mol. Genet*. 2013; 22:2350–60.
142. Lee T, Li YR, Ingre C, Weber M, Grehl T, Gredal O, et al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions in European ALS patients. *Hum Mol Genet*. 2011;20:1697-700.
143. Neuenschwander AG, Thai KK, Figueroa KP, Pulst SM. Amyotrophic lateral sclerosis risk for spinocerebellar ataxia type 2 ATXN2 CAG repeat alleles: a meta-analysis. *JAMA Neurol*. 2014;71:1529-34.
144. Wang MD, Gomes J, Cashman NR, Little J, Krewski D. Intermediate CAG repeat expansion in the ATXN2 gene is a unique genetic risk factor for ALS--a systematic review and meta-analysis of observational studies. *PLoS One*. 2014;9:e105534.
145. Narain P, Gomes J, Bhatia R, Singh I, Vivekanandan P. C9orf72 hexanucleotide repeat expansions and Ataxin 2 intermediate length repeat expansions in Indian patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*. 2017;56:211.e9-211.e14.
146. Sproviero W, Shatunov A, Stahl D, Shoai M, van Rheenen W, Jones AR, et al. ATXN2 trinucleotide repeat length correlates with risk of ALS. *Neurobiol Aging*. 2017;51:178.e1-178.e9.
147. van Es MA, Hardiman O, Chio A, Al-Chalabi A, Pasterkamp RJ, Veldink JH, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*. 2017;390:2084-98.
148. Ostrowski LA, Hall AC, Mekhail K. Ataxin-2: From RNA Control to Human Health and Disease. *Genes (Basel)*. 2017; 8:1-21.
149. Vucic S, Rothstein JD, Kiernan MC. Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: Insights from pathophysiological studies. *Trends Neurosci*. 2014; 37: 433–42.
150. Becker LA, Huang B, Bieri G, Ma R, Knowles DA, Jafar-Nejad P, et al. Therapeutic reduction of ataxin-2 extends lifespan and reduces pathology in TDP-43 mice. *Nature*. 2017; 20:367-71

8 - Anexos

Anexo I



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 26/06/12
(PARECER CEP: N° 270/2011)

PARECER

I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO DE BIOMARCADORES EM DOENÇAS DO NEURÔNIO MOTOR”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Marcondes Cavalcante França Junior

II – PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP aprovou o Relatório Parcial, apresentado em maio de 2012, do protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III – DATA DA REUNIÃO

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de junho de 2012.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-857 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 24/05/11
(Grupo II)

PARECER CEP: Nº 270/2011 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0214.0.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "ESTUDO DE BIOMARCADORES EM DOENÇAS DO NEURÔNIO MOTOR".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Marcondes Cavalcante França Junior

INSTITUIÇÃO: Hospital de Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 12/04/2011

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 24/05/12 (O formulário encontra-se no site acima).

II - OBJETIVOS.

Avaliar a utilidade da ressonância magnética, da ENMG e do estudo de microRNAs como biomarcadores em ELA.

III - SUMÁRIO.

Serão incluídos cerca de 40 pacientes seguidos no ambulatório de doenças neuromusculares do HC/UNICAMP. Os pacientes serão submetidos a uma avaliação clínica e será feito um estudo de imagem. Todas as imagens adquiridas serão armazenadas em banco de dados no laboratório de neuroimagem. Será feito o estudo de neurofisiologia por ENMG. Será coletada uma amostra de sangue para os estudos de miRNA.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES.

Projeto bem redigido, com Termo de Consentimento Livre e Esclarecido longo, mas com todas as informações necessárias. Apresenta orçamento tendo como fonte o CNPq. Está de acordo com as Resoluções do CNS.

V - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES.

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e).

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de maio de 2011.

Carlos Eduardo Steiner
Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo III

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: Estudo de biomarcadores em doenças do neurônio motor

Investigadores principais: Drs Marcondes C. França Jr e Milena de Albuquerque

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu _____ entendo que fui convidado (a) a participar em um projeto de pesquisa envolvendo pacientes com doença do neurônio motor. O objetivo geral do estudo é o de avaliar a utilidade de alguns exames para facilitar o diagnóstico e melhorar a estimativa de prognóstico dos pacientes com esta doença. Essa pesquisa levará também a um melhor conhecimento sobre as doenças do neurônio motor e pode no futuro levar a uma melhora no tratamento. As informações médicas a meu respeito que forem obtidas para esse estudo, poderão ser compartilhadas com outros pesquisadores. Podendo assim ser utilizadas para outros fins de pesquisa sobre as doenças do neurônio motor, desde que este novo projeto tenha aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da FCM-Unicamp. O sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

Os objetivos principais deste estudo são:

- Avaliar a utilidade da eletroneuromiografia para o diagnóstico e acompanhamento de pacientes com doenças do neurônio motor;
- Avaliar a utilidade da ressonância magnética para o diagnóstico e acompanhamento de pacientes com doenças do neurônio motor;
- Avaliar a utilidade de exames genéticos para o diagnóstico e acompanhamento de pacientes com doenças do neurônio motor;

Este estudo envolve a realização de:

- Avaliação clínica, com revisão da história clínica, e exame neurológico detalhado
- Coleta de sangue periférico para a pesquisa genética
- Realização de ressonância magnética: é uma técnica capaz de produzir imagens de alta qualidade e resolução (nitidez) anatômica, assim como informações sobre os tecidos. Essas imagens também poderão produzir informações que serão úteis para melhor definição do diagnóstico e tratamento.
- Realização de eletroneuromiografia.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e de minha família. Eu serei submetido a um exame físico neurológico para estabelecer meu estado clínico, além dos exames de sangue, eletroneuromiografia e ressonância magnética. Hospitalização não será necessária.

A coleta de sangue é a mesma que é realizada para exames de rotina, e será feita em uma veia periférica no antebraço. O meu sangue será armazenado por no máximo 5 anos, após a sua coleta. Eu () autorizo () não autorizo a utilização do meu sangue para novas pesquisas, desde que/mesmo que estas tenham sido aprovadas pelo Comitê de Ética do HC-Unicamp.

O procedimento de ressonância magnética é semelhante a uma tomografia. Eu fui informado que eu serei colocado em uma maca e serei movido lentamente para dentro do aparelho de ressonância magnética. Um alto falante dentro do aparelho de ressonância magnética possibilita a minha constante comunicação com as pessoas responsáveis pelo exame. Durante todo o tempo o pessoal médico e paramédico pode me ver e ouvir, e eu posso ser removido(a) se for preciso; por exemplo, se durante o exame eu me sentir mal ou com ansiedade por permanecer em local fechado. O procedimento pode durar entre 45 a 60 minutos. Durante a primeira parte do exame eu irei ouvir ruídos, tipo marteladas, por alguns minutos enquanto o aparelho faz as imagens do meu cérebro. O restante do exame será relativamente silencioso.

O exame de eletroneuromiografia é semelhante ao que foi realizado para a confirmação do seu diagnóstico. Você ficará deitado em uma maca, e serão aplicados cerca de 10 pequenos choques na região próxima ao punho em ambos os lados. Não será realizado exame com agulha. Este procedimento dura em média 20 minutos.

VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem com a minha participação nesse estudo e que o meu diagnóstico e o meu tratamento provavelmente não serão modificados. Contudo, os resultados desse estudo podem, em longo prazo, oferecer vantagens para os indivíduos com doenças do neurônio motor, possibilitando um melhor diagnóstico e futuramente um tratamento mais adequado. Os resultados de meus exames ficarão a disposição dos médicos responsáveis pelo meu tratamento, e poderão ser úteis no futuro.

RISCO E DESCONFORTO:

Não há riscos envolvidos com a coleta de sangue periférico. Pode haver certo desconforto no momento da coleta, assim como formação de um pequeno hematoma. O único desconforto relacionado a ressonância magnética é o ruído intermitente durante os primeiros 15 minutos. Depois disso o ruído será muito menor. O pessoal técnico providenciará tampa-ouvidos para me deixar mais confortável. Uma das principais vantagens da ressonância magnética é que esta não utiliza raios X ou outro tipo de radiação ionizante, ao contrário de outros tipos de exame radiológicos. As imagens são obtidas graças a um campo magnético (imã), um transmissor e receptor de ondas de rádio e um computador que é utilizado para obter as informações bioquímicas e imagens da anatomia interna. Não existem efeitos nocivos associados com a ressonância magnética dentro das condições utilizadas atualmente. **É muito importante** informar aos médicos(as) e técnicos(as) caso eu tenha um **marca-passo cardíaco, um clipe de cirurgia para aneurisma cerebral ou qualquer outro objeto metálico em meu corpo**, que tenha sido implantado durante uma cirurgia ou alojado em meu corpo durante um acidente, pois estes podem parar de funcionar ou causar acidentes devido ao forte campo magnético que funciona como um imã muito forte. Eu **também devo remover todos os objetos metálicos** que estiverem comigo (relógio, canetas, brincos, colares, anéis, etc), pois estes também podem movimentar ou aquecer dentro do campo magnético.

O único desconforto que pode ocorrer durante a eletroneuromiografia deve-se aos choques elétricos, mas estes são quase instantâneos (duram menos de 1 segundo)

SIGILO

Eu entendo que todas as informações médicas decorrentes desse projeto de pesquisa farão parte do meu prontuário médico e serão submetidos aos regulamentos do HC- UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL

Eu entendo que posso pedir informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. O Dr. Marcondes C. França Junior (19) 3521-7754/ 3521-9217, estará disponível para responder minhas questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (19) 3521-8936.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC- UNICAMP.

ACEITAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Eu confirmo que o(a) Dr(a) _____ me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos, desconforto e possíveis vantagens que venham desse projeto de pesquisa. Eu concordo com a realização da coleta de sangue, eletroneuromiografia e da ressonância magnética. Eu afirmo que li e compreendi esse formulário de consentimento e estou de acordo em participar desse estudo.

Nome do participante ou responsável _____

Assinatura do participante ou responsável _____

_____ data

Nome da testemunha _____

Assinatura da testemunha _____

_____ data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome do pesquisador ou associado _____

Assinatura do pesquisador ou associado _____

_____ data

Anexo IV



Helen Andrade <helenmaiatandrade@gmail.com>

ENC: Neurobiology of Aging: Submission Confirmation and Timelines

1 mensagem

mcfrancajr@uol.com.br <mcfrancajr@uol.com.br>

26 de janeiro de 2018 12:24

Para: "helenmaiatandrade@gmail.com" <helenmaiatandrade@gmail.com>

Marcondes França, MD, PhD
 Professor doutor / Assistant professor
 Doenças Neuromusculares e Neurogenética / Neuromuscular and Neurogenetics
 Depto de Neurologia / Dept of Neurology
 Faculdade de Ciências Médicas / School of Medical Sciences
 UNICAMP

De: "Neurobiology of Aging" <eesserver@eesmail.elsevier.com>

Enviada: 2018/01/26 12:23:34

Para: mcfrancajr@uol.com.br

Assunto: Neurobiology of Aging: Submission Confirmation and Timelines

Neurobiology of Aging

Title: Intermediate-length CAG repeat in ATXN2 is associated with increased risk for amyotrophic lateral sclerosis in Brazilian patients

Corresponding Author: Dr. Marcondes C. França Jr

Authors: Helen M Andrade, MD; Vivian P Cintra, PhD; Milena de Albuquerque, MD, PhD; Camila C Piccinin, MD; Luciana C Bonadia, PhD; Daniel S de Oliveira, MD; Rafael E Duarte Couteiro; Rinaldo Claudino, MD; Marcus Vinicius M Gonçalves, MD; Mario Emilio T Dourado Jr, MD, PhD; Leonardo C de Souza, MD, PhD; Antonio Lucio Teixeira Jr, MD, PhD; Vitor Tumas, MD, PhD; Laura de Godoy R Prado, MD, PhD; Acary S Bulle Oliveira, MD, PhD; Anamarli Nucci, MD, PhD; Iscia Lopes-Cendes, MD, PhD; Wilson Marques Jr, MD, PhD;

Dear Dr. França Jr,

Thank you for sending your manuscript to Neurobiology of Aging. Each manuscript undergoes a thorough review process, which, if all proceeds smoothly, takes about 6 weeks. Please direct all correspondence regarding this manuscript to me at the below address, phone, fax, and email. Your paper will be given a manuscript number shortly, and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

You will also be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System for Neurobiology of Aging as an author:

<https://ees.elsevier.com/nba/>

Your username is: mcfrancajr@uol.com.br

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/NBA/automail_query.asp

Sincerely,
 Peter Rapp, PhD
 Editor-in-Chief
 Neurobiology of Aging

 Pamela Yeh
 Managing Editor
 Neurobiology of Aging
pamelalyeh@gmail.com

 For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here

Anexo V



SEARCH CART MENU

Home (<https://www.elsevier.com>) > About (<https://www.elsevier.com/about>) > Press releases (<https://www.elsevier.com/press-releases>) > Corporate - Press Inf. > Elsevier further libera...

Elsevier further liberalizes copyright for authors

Policy now allows for final version web posting.

Share this:

Amsterdam, 3 June, 2004 - Authors of papers published in any Elsevier journal can now post the final text of their articles, as accepted by the journal, i.e. with all of the changes made during the peer-review and editing process, on the authors' personal or their institutions' web sites.

For several years, Elsevier has permitted the posting of pre-print versions of articles without requiring permission. Now, no permission is required for authors to revise and widely post the final version of the text, provided that the posting contains a link to the home page of the journal in which the article was published, and that the posting is not used for commercial purposes -- such as systematic distribution or creating links for commercial customers to articles. However, to preserve the integrity of the official record of publication, the final published version as it appears in the journal (PDF and HTML) will continue to be available only on an Elsevier site.

"Elsevier's policy on author postings clearly supports scholarly communications. We have a strong history of allowing authors to use their Elsevier-published articles within their institutions for teaching and sharing with colleagues, and to create derivative works.

"Several years ago, we supported the development of pre-print servers by deciding papers posted to such servers would not be viewed as 'prior submissions.' Furthermore, following Elsevier's publication of papers, we have not required the removal of pre-print versions from pre-print servers. But we have gone even further than that: for several years we have permitted authors to post their final version as accepted on secure, internal institutional networks. Today, we have taken an important step, which demonstrates our continued support for scholarly communications.

"We are not only announcing the extension or further liberalization of our policy, we are also reaffirming prior policy, to ensure that our authors' needs are being met," said Arie Jongejan, CEO, Science and Technology, Elsevier.

Additional Information:

The June issue of the **SPARC Open Access Newsletter, Issue #74** (<http://www.earlham.edu/~peters/fos/newsletter/06-02-04.htm#elsevier>) contains interesting comments on Elsevier's policy revision.

About Elsevier

Elsevier (<https://www.elsevier.com>) is a global information analytics business that helps institutions and professionals advance healthcare, open science and improve performance for the benefit of humanity. Elsevier provides digital solutions and tools in the areas of strategic research management, R&D performance, clinical decision support and professional education, including ScienceDirect (<https://www.elsevier.com/solutions/sciencedirect>), Scopus (<https://www.elsevier.com/solutions/scopus>), SciVal (<https://www.elsevier.com/solutions/scival>), ClinicalKey (<https://www.elsevier.com/solutions/clinicalkey>) and Sherpath (<https://www.elsevier.com/solutions/sherpath>). Elsevier publishes over 2,500 digitized journals, including *The Lancet* (<http://www.thelancet.com>) and *Cell* (<http://www.cell.com>), more than 38,000 e-book titles and many iconic reference works, including *Gray's Anatomy* (<https://www.elsevier.com/books/grays-anatomy/standing/978-0-7020-5230-9>). Elsevier is part of RELX Group (<http://www.relxgroup.com>), a global provider of information and analytics for professionals and business customers across industries. www.elsevier.com (<https://www.elsevier.com>)

Solutions

Solutions

Researchers

Researchers

About Elsevier

About Elsevier

How can we help?

How can we help?

Select country/language

Global English



(<https://www.elsevier.com>)

ELSEVIER

Copyright © 2018 Elsevier, except certain content provided by third parties

Cookies are used by this site. To decline or learn more, visit our [Cookies](https://www.elsevier.com/legal/use-of-cookies) (<https://www.elsevier.com/legal/use-of-cookies>) page.