

Agnes Lumi Nishimura

Identificação de um novo gene para a esclerose lateral amiotrófica  
tipo 8 e  
estudos de associação em doença de Alzheimer

São Paulo  
2006

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Agnes Lumi Nishimura

---

Identificação de um novo gene para a esclerose  
lateral amiotrófica tipo 8 e  
estudos de associação em doença de Alzheimer

Tese apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade de São  
Paulo, para a obtenção de Título de  
Doutor em Ciências, na Área de  
Biologia/Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Mayana Zatz

São Paulo

2006

## Ficha Catalográfica

Nishimura, Agnes Lumi

Identificação de um novo gene para a esclerose lateral amiotrófica tipo 8 e estudos de associação em Doença de Alzheimer

pag

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Doenças genéticas 2. Esclerose Lateral Amiotrófica 3. Doença de Alzheimer I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

## Dedicatória

---

*A Deus,  
Aos meus pais e irmãos*

## Dedicatória

---

*A Silvia Beatriz,*

*Lecy,*

*Selma,*

*Bernadete,*

*Aos Josés, Maria das Graças, Custódias,*

*Pela coragem, perseverança e confiança...*

## Epígrafe

---

### **Time Of Your Life (Green Day)**

Another turning point  
A fork stuck in the road  
Time grabs you by the wrist  
Directs you where to go  
So make the best of this test  
And don't ask why  
It's not a question  
But a lesson learned in time  
It's something unpredictable  
But in the end is right  
I hope you had the time of your life  
(...)

*“The more I see, the more I know. The more I know, the less I understand”*

Paul Weller

## Agradecimentos

---

Inicialmente eu gostaria de agradecer a Mayana por todos esses anos de convívio. Não teria palavras para expressar a minha imensa gratidão e admiração por tudo o que foi feito e dito nesses anos, desde a iniciação científica até o término do doutorado. Com ela eu aprendi qual é o valor de um trabalho bem feito, a importância de colaborações, o respeito pelo próximo e acima de tudo eu agradeço a confiança que foi depositado em mim e no meu trabalho desde o início.

Agradeço a Dra. Maria Rita Passos-Bueno por todos os momentos de dúvidas e expresse minha mais profunda admiração pela sua pessoa e pelo seu trabalho.

A Dra. Célia Koiffmann, Dra. Cris Miyaki, Dra. Lygia Pereira da Veiga, Dra. Lyria Mori, Dr. Sérgio Matioli e Dra. Mariz Vainzof.

Aos professores do IB e de outros institutos.

Ao querido Professor Paulo Otto, pelas análises estatísticas.

Aos neurologistas e psiquiatras que me ensinaram muito e com quem convivi buscando colaborações e desenvolvimento de projetos, Márcia Nery, Dr. Ricardo Nitrini, Dra. Valéria Bahia, Dr. Paulo Roberto Brito-Marques, Dr. Paulo Bertolucci, Dr. Antônio Richieri-Costa, Dr. Acary Oliveira e um agradecimento especial à Dra. Helga Cristina Silva e Dr. Fernando Kok.

A Dra. Rita Pavanello, Cláudia, Sr. Valter, Miguel, Kátia, Marta, Lílian, Roberto.

Aos meus amigos do laboratório; os que saíram: Luciana, Andréa Bernardino, Maria Cristina, Fábio, Fernanda, Alex, Tiago, Todd, Carlos, Natale, Felipe. Os que ficaram: Cláudia, Patrícia, Alessandra, Natássia, Cibele, Lúcia, Oscar, Daniela, Fernanda, Andréia, Roberto, Flavia Errera, Inês, Viviane(s), Lydia e Marta.

Não poderia deixar de mencionar as grandes amigas que passaram pelo laboratório: Flavia de Paula, Kikue, Sofia, Dulci. Agradeço pela amizade, convívio, festas, almoços, viagens e, claro, discussões científicas.

Especial agradecimento a Manuela pela amizade, viagens, conversas, discussões científicas e ainda por revisar alguns capítulos desta tese.

Agradeço também ao Roberto, pela amizade e pela revisão de outros capítulos.

A Toninha, que me deu carona nos dias difíceis, pelo companheirismo, amizade, pelo convívio diário e pelo seu bom coração. Aos churrascos, festas e almoços agradáveis com a sua família.

Especial agradecimento aos alunos que trabalharam diretamente comigo: Camila, Sofia, Fábio e Monize pela santa paciência e pelo convívio. Um agradecimento especial ao Miguel, que se dedicou tanto no desenvolvimento desse projeto.

Ao João que me ajudou desde o início. Agradeço pelas vezes que você e sua família me abrigaram durante uma coleta em Recife e pela minha visita a UCLA.

Aos nossos colaboradores: Dr. Duílio Cascio, Dr. George Jackson, Dr. Hugo Bellen, Dr. Giusy Pennetta, Dr. Sima Lev, Dr. Timothy Levine, Dr. Ammar Al-Chalabi e principalmente Dr. Paul Skehel e seu grupo.

Agradeço ainda Dr. Chris Shaw pelo cuidado, carinho e preocupação durante os meus primeiros dias em Londres. Além da supervisão, discussões científicas e novas idéias e projetos.

Ao pessoal do IOP, Brad, Steve, Paul, Nicoletta, Lucy, Caroline, Khok-Fai, Lisa, Xhu, Isabella, Renata, Livia e Janaina. Agradecimento especial a Naghmeh e Emi meus amigos de conversa, almoços e pic-nics no Ruskin Park durante o verão. A Els que se juntou a nós nos últimos três meses. À Camila por sua atenção e carinho.

Agradecimento especial ao José que me incentivou a terminar essa tese e sempre me apoiou com muito amor, carinho e paciência.

A Constância pelo carinho e dedicação.

A Helenice e Deise.

Aos meus pais pelo apoio, incentivo e compreensão. Aos meus irmãos pela companhia e convívio.

Aos pacientes com doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica e principalmente os de diagnóstico indefinido, além de seus familiares que depositaram confiança em mim e no nosso trabalho.

Aos estudantes e funcionários da Universidade de São Paulo, Universidade Federal de São Paulo, Universidade Federal de Pernambuco e Faculdade de Medicina de Recife que nos auxiliaram na coleta de controles saudáveis para o estudo em doença de Alzheimer. Ao grupo de idosos do CEPE-USP e em especial Dona Ruth e Dr. Hamilton.

Ao Departamento de Biologia do IB, secretaria de graduação e Pós-graduação e à Universidade de São Paulo. À Pró-Reitoria de Pós-Graduação, à FAPESP e ao CNPq.

Aos colegas que esqueci de mencionar aqui.

A todos, muito obrigado.

## Índice

---

<b>Capítulo 1. Introdução à Esclerose Lateral amiotrófica</b>	01
1. Doenças do Neurônio Motor	02
1.1. Amiotrofia espinhal progressiva (AEP)	05
1.1.1. Bases genéticas da AEP tipo 1, 2 e 3	06
1.1.2. AEP tipo 4 (forma adulta)	06
1.2. Esclerose lateral amiotrófica (ELA)	07
1.2.1. Os tipos de ELA	08
1.2.1.1. Classificação baseada nas áreas do corpo	08
I. ELA de início bulbar	08
II. ELA de início nos membros	09
1.2.1.2. Classificação baseada no modo de herança	09
I. Casos familiares	09
II. Casos isolados (esporádicos)	10
III. ELA Guam	10
1.2.2 Aspectos genéticos	11
I. Formas familiares	11
I.1. ELA1	12
I.2. ELA2	14
I.3. ELA3	15
I.4. ELA4	16
I.5. ELA5	18
I.6. ELA6	19
I.7. ELA7	20
I.8. ELA/DFT	20
II. Formas esporádicas	21
II.1. Neurofilamentos	21
II.2. Periferina	22
II.3. Fator neurotrófico ciliar	22
II.4. Apolipoproteína E	24
II.5. Fator de crescimento vascular endotelial	25
1.2.3 Hipóteses para a ELA	28

I. Excitotoxicidade	28
II. Hipótese oxidativa	29
III. Acúmulo protéico e estrangulamento axonal	30
IV. Exposição a reagentes tóxicos	31
V. Exposição a metais pesados	32
1.2.4 Tratamento	34
1.3. Objetivos	35
<b>Capítulo 2. Pacientes e métodos</b>	<b>37</b>
1. Pacientes e controles	37
2. Métodos	48
2.1. Extração de DNA de sangue periférico	48
2.2. Análise de DNA	50
2.2.1. Amplificação do DNA por meio de <i>PCR</i>	50
I. Análise de microssatélites	51
I.1. <i>PCR</i> fluorescente	51
I.2. <i>PCR</i> com isótopo radioativo ( $P_{32}$ )	52
II. Triagem de mutações no gene VAP-B	52
2.3. Análise de <i>LOD Score</i>	52
2.4. Seqüenciamento	54
2.4.1. Purificação	54
2.4.2. Reação de Seqüência	54
2.5. Cultura de células <i>CHO</i>	55
2.5.1. Passagem	56
2.6. RNAi	56
2.6.1. Oligonucleotídeos	56
2.6.2. Reação de anelamento ( <i>annealing</i> )	56
2.6.3. Transfecção	57
2.6.4. Lisado celular	59
2.6.5. <i>Western blot</i>	59
I. Transferência para membrana de nitrocelulose	60
II. Revelação	61
2.7. Análise de haplótipos	62
2.8. Soluções	62

<i>Capítulos 2 – Pacientes e Métodos</i>	14
<b>Capítulo 3.</b> Um novo loco para ELA familiar do tipo tardia	67
<i>Abstract/Resumo</i>	68
<b>Capítulo 4.</b> Mutação no gene VAP-B causa a ELA8	76
<i>Abstract/Resumo</i>	77
<b>Capítulo 5.</b> Efeito fundador na ELA8	88
<i>Abstract/Resumo</i>	89
<b>Capítulo 6.</b> Inativação da VAP-B por meio do RNA de interferência	92
<i>Abstract/Resumo</i>	93
Introdução	94
Materiais e métodos	94
Resultados preliminares e discussão	96
<b>Capítulo 7.</b> Introdução à Doença de Alzheimer	99
7.1. Doença de Alzheimer: Diferenças étnicas nos genes de risco	100
7.2. Formas familiares	100
7.3. Casos isolados e fatores de susceptibilidade para DA	103
7.4. Hipóteses para a DA	104
7.4.1. Hipótese da proteína Tau	105
7.4.2. Hipótese amilóide	105
7.4.3. Outras hipóteses	107
7.5. Vacina para a doença de Alzheimer?	108
7.6. Objetivo	109
<b>Capítulo 8.</b> Ausência de associação entre BDNF e DA	112
<i>Abstract/Resumo</i>	113
<b>Capítulo 9.</b> Polimorfismo na MAOA em pacientes com DA	119
<i>Abstract/Resumo</i>	120
<b>Capítulo 10.</b> Ausência de associação entre interleucinas e DA	126
<i>Abstract/Resumo</i>	127
<b>Capítulo 11.</b> Conclusões e Discussões	138
11.1 Esclerose lateral amiotrófica tipo 8	139
11.2 Doença de Alzheimer não familiar	147

<i>Capítulos 2 – Pacientes e Métodos</i>	15
<b>Capítulo 12. Referências</b>	153
Referências bibliográficas	153
Referências eletrônicas	171
<b>Capítulo 13. Anexos</b>	172

## Índice de figuras

---

Figura. 1:	Representação dos neurônios motores	03
Figura. 2:	Hipóteses aceitas para a patogênese da ELA	33
Figura. 3:	Atuação do glutamato e de seu transportador	33
Figura. 4:	Heredogramas das famílias com mutação no gene <i>VAP-B</i>	38
Figura. 5:	Distribuição dos pacientes de ELA8 no Brasil	47
Figura. 6:	Seqüência de oligonucleotídeos para o RNAi	58
Figura. 7:	Seqüência de cDNA da <i>VAP-B</i>	59
Figura. 8:	Heredograma da família 3 (fig.1 do Capítulo3)	71
Figura. 9:	<i>LOD score</i> multipontos (fig. 2 do Capítulo 3)	73
Figura. 10:	Análise de mutação na <i>VAP-B</i> (fig. 1 do Capítulo 4)	79
Figura. 11:	Análises do gene <i>VAP-B</i> (fig. 2 do Capítulo 4)	82
Figura. 12:	A <i>VAP-B</i> em células em cultura (fig. 3 do Capítulo 4)	85
Figura. 13:	Esquema da ação do RNA de interferência	97
Figura. 14:	Eletroforese de proteínas ( <i>western blot</i> ) em gel 10%	98
Figura. 15:	Neuropatologia da Doença de Alzheimer	102
Figura. 16:	Esquema da proteína precursora beta-amilóide (APP)	102
Figura. 17:	Proteína tau e Doença de Alzheimer	106
Figura. 18:	Expressão da <i>VAP-B</i> em neurônios (Capítulo 13)	173
Figura. 19:	Biópsia muscular de pacientes com ELA8 (Capítulo 13)	174
Figura. 20:	Fotos de paciente com mutação no gene <i>VAP-B</i> (Capítulo 13)	175

---

## Índice de tabelas

---

Tabela. 1:	Sinais clínicos em pacientes com DNM	04
Tabela. 2:	Nove locos para a ELA familiar	12
Tabela. 3:	Marcadores utilizados para restringir a região	65
Tabela. 4:	Seqüência de oligonucleotídeos do gene VAP-B	66
Tabela. 5:	Características clínicas da ELA8 (tabela 1 do Capítulo 3)	72
Tabela. 6:	Análise de <i>LOD score</i> em 20q13 (tabela 2 do Capítulo 3)	72
Tabela. 7:	Avaliação clínica em ELA8 (tabela 1 do Capítulo 4)	81
Tabela. 8:	Análise de haplótipo em ELA8 (tabela 1 do Capítulo 5)	91
Tabela. 9:	Locos de susceptibilidade em Doença de Alzheimer	110
Tabela. 10:	Distribuição genotípica de C-270T em DA e controles	116
Tabela. 11:	Freqüência alélica e genotípica de MAOA em DA	123
Tabela. 12:	Freqüência alélica e genotípica de 5HTTLPR em DA	123
Tabela. 13:	Distribuição da ApoE e das IL-1 em pacientes com DA	134
Tabela. 14:	Lista de pacientes estudados com ELA8 (Capítulo 13)	176

## Abreviaturas

---

5-HT – *5-hydroxytryptamine* (serotonina)  
5HTTLPR – *5-HT transporter - linked polymorphic region*  
A2M – alfa-2 macroglobulina  
AbrELA – Associação Brasileira de ELA  
AD – autossômico dominante  
AEP – amiotrofia espinhal progressiva  
APOE – apolipoproteína E  
APP – proteína precursora amilóide  
AR – autossômico recessivo  
Arg – arginina  
ALS – *Amyotrophic Lateral Sclerosis*  
ALSA– *Amyotrophic Lateral Sclerosis association*  
ALS2 – alsina  
AME – atrofia muscular espinhal  
AMP – atrofia muscular progressiva  
BDNF – *brain derived neurotrophic factor*  
C-terminal – Carboxiterminal  
cDNA – DNA complementar  
cM – centiMorgan  
CHO – *Chinese Hamster Ovary*  
CNTF – *ciliary neurotrophic factor*  
CuZnSOD – Cobre-Zinco superóxido dismutase  
Cys - cisteína  
DA – doença de Alzheimer  
DFT – doença fronto-temporal  
DH5- $\alpha$  - *Douglas Hanahan bacterial stain 5  $\alpha$*   
DNM – doença do neurônio motor  
DMSO – *dimethylsulphoxide*  
EAAT1 – *excitatory amino acid transporters 1*  
EAAT2 – *excitatory amino acid transporters 2*  
ELA – esclerose lateral amiotrófica  
ELP – esclerose lateral primária  
EGFP – *enhanced green fluorescent protein*  
ENMG – eletroneuromiografia  
EOAD – *early onset Alzheimer Disease*  
ERO – espécies reativas de oxigênio (ou ROS – *reactive oxygen species*)  
F-12 (Ham) – *Ham's nutrient mixture F-12*  
FCS – *fetal calf serum*  
GEF – *guanine nucleotide exchanging factor*  
HRE – *hypoxia response element*  
IDE – *insulin degrading enzyme*  
IB – Instituto de Biociências  
IL- interleucinas  
Kb - quilobases  
KD (KDa) – quilodalton  
LB – Luria-Bertani  
LOAD – *late onset Alzheimer Disease*  
LRP1 – *low density lipoprotein receptor-related protein*  
MAPT – *microtubule-associated protein tau*

Mb – megabases  
MIM – *mendelian inheritance in man*  
MNDA – *motor neuron disease association*  
mRNA – RNA mensageiro  
MRC – *Medical Research Council*  
N-terminal – aminoterminal  
NEF – neurofilamentos  
NEFL – neurofilamentos de cadeia leve  
NEFM – neurofilamentos de cadeia média  
NEFH – neurofilamentos de cadeia pesada  
NM – neurônio motor  
NMDA – *N-methyl-D-aspartic acid*  
NMI – neurônio motor inferior  
NMS – neurônio motor superior  
NO – óxido nítrico  
ROS – *reactive oxygen species*  
SETX – senataxina  
SMN – *survival of motor neuron*  
SOD1 – superóxido dismutase 1  
OMIM – *online mendelian inheritance in man*  
pb – pares de base (nucleotídeo)  
P56S – transição de uma prolina para uma serina no aminoácido 56  
PBS – *phosphate buffered saline*  
PBST – *phosphate buffered saline Tween 20*  
PBP – paralisia bulbar progressiva  
PFA – paraformaldeído  
PS1 – Presenilina 1  
PS2 – Presenilina 2  
PPP – paralisia pseudobulbar progressiva  
RNAi – RNA de interferência  
siRNA – *small interfering RNA*  
SSCP – *single stranded conformational polymorphism*  
TBS – *tris buffered saline*  
TBST – *tris buffered saline Tween 20*  
TNFA – fator de necrose tumoral alfa  
UBQLN1 – *ubiquilin 1*  
uPA – *urokinase-type plasminogen activator*  
UTR – *untranslated region* (região não traduzida)  
USP – Universidade de São Paulo  
VAMP- *vesicle-associated membrane protein*  
VAP-B – *VAMP-associated protein B*  
VEGF – *vascular endothelial growth factor*

## Capítulo 1

---

## **Introdução a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)**

### **1. Doenças do Neurônio Motor**

As doenças do neurônio motor (DNM) compreendem um grupo de doenças clínicas e geneticamente heterogêneas que envolvem os neurônios

motores (NM). Eles são os responsáveis pelo controle do movimento muscular dos membros e da região bulbar.

O termo “doença do neurônio motor” é o mais utilizado para descrever uma família de doenças na qual há um extensivo diagnóstico diferencial. No passado, esse termo era sinônimo de esclerose lateral amiotrófica (ELA).

Na prática, o diagnóstico diferencial requer uma investigação clínica e eletrofisiológica para verificar se a doença compromete o neurônio motor superior – NMS (proveniente do córtex cerebral) e/ou neurônio motor inferior - NMI (originados na porção anterior ou ventral - corno anterior - da medula espinhal) Figura 1.

Os sinais clínicos envolvendo a degeneração dos NMI's consistem em fraqueza e atrofia muscular, inicialmente ocorrendo nas mãos, braços e pernas, em que alguns grupos musculares são primariamente mais acometidos que outros. Além disso, observam-se câibras e fasciculação (contrações involuntárias, rápidas e não-dolorosas), principalmente na musculatura do abdômen (Tabela 1).

Estudos de condução nervosa irão excluir neuropatia periférica e a eletroneuromiografia (ENMG) auxilia no diagnóstico de desnervação por ação miopática ou neuropática. Na ENMG de pacientes portadores de ELA, deve-se observar o comprometimento em pelo menos duas regiões (bulbar, cervical, torácica e/ou lombossacral).

O envolvimento do NMS leva à espasticidade, clônus (movimento involuntário rápido alternando contração e relaxamento muscular), fraqueza e resposta extensora plantar ou sinal de Babinski (sinal clínico neurológico que detecta lesões na porção piramidal do sistema motor).

Alguns indivíduos apresentam fraqueza na musculatura facial e do pescoço, causando disartria (comprometimento da fala e linguagem) e disfagia (dificuldade na mastigação e deglutição).

Os reflexos abdominais, controle de esfíncter, intelecto e os sentidos (tato, olfato, paladar, audição e visão) na grande maioria dos casos estão preservados.

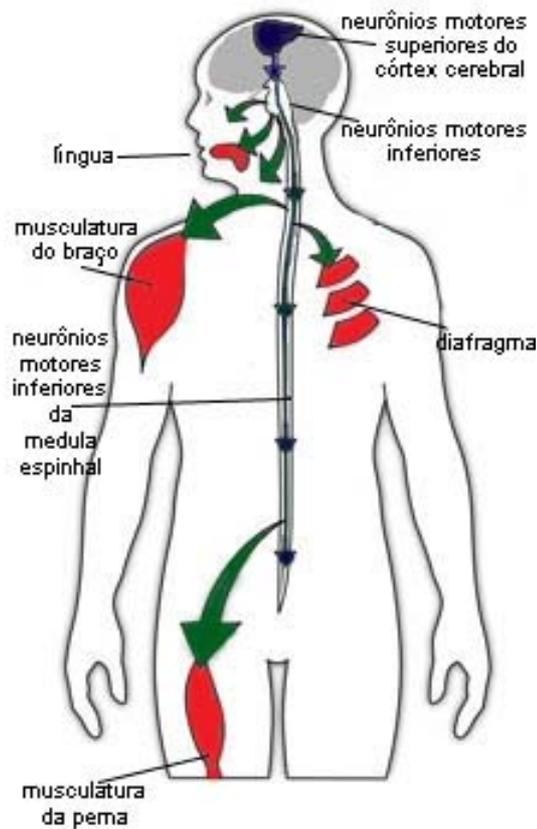


Figura. 1: Representação dos neurônios motores. Os neurônios motores superiores enviam sinais para os neurônios motores inferiores, que os repassam para os músculos (traduzido de <http://www.mdausa.org/publications/alscare/what.htm>).

Tabela 1: Sinais clínicos observados em pacientes com doença do Neurônio Motor

<i>DNMS</i>	<i>DNMI</i>	<i>Sinais bulbares</i>
Hiperreflexia, Sinais de Hoffmann ou Babinski	Atrofia e fraqueza muscular, Fasciculações	Disartria Disfagia
Clônus	Hiporreflexia	Sialorréia
Espasticidade	Cãibras musculares	-

As DNM são progressivas, variáveis e a grande maioria tem início na fase adulta, acima dos 30 anos com maior incidência entre os 50-70 anos.

Há, entretanto as formas juvenis ou precoces, com início na adolescência. Em geral, há mais homens que mulheres afetadas pelas DNM.

Estima-se que a incidência seja de aproximadamente 2:100.000 habitantes e a prevalência 7:100.000.

As DNM podem ser classificadas de acordo com o neurônio motor envolvido, como por exemplo, as “doenças do neurônio motor superior”: paralisia pseudobulbar progressiva (PPP) e esclerose lateral primária (ELP); as “doenças do neurônio motor inferior”: atrofia muscular espinobulbar (tipo Kennedy), paralisia bulbar progressiva (PBP) e amiotrofia espinhal progressiva (AEP) e a “**doença do neurônio motor superior e inferior**”: a combinação da degeneração dos neurônios motores superiores e inferiores associados ao envolvimento bulbar e do trato piramidal que resultará na esclerose lateral amiotrófica (ELA).

Entretanto há casos em que ocorre sobreposição de sinais e sintomas dificultando o correto diagnóstico clínico, principalmente quando somente o neurônio motor inferior é acometido. A investigação clínica aliada aos exames moleculares dará o correto diagnóstico da doença.

Nesse capítulo somente a amiotrofia espinhal progressiva e a esclerose lateral amiotrófica serão abordadas.

### **1.1. Amiotrofia espinhal progressiva (AEP)**

A amiotrofia espinhal progressiva (AEP), comumente conhecida como atrofia muscular progressiva (AMP) ou atrofia muscular espinhal (AME), é uma das mais graves doenças autossômicas recessivas da infância e adolescência. Estima-se que sua incidência seja 1:6.000-10.000 dependendo da população.

Os pacientes com AEP apresentam fasciculação, parálise e atrofia muscular, levando a uma fraqueza muscular simétrica.

Ela pode ser subdividida de acordo com a idade de início e gravidade dos sintomas. A idade de início é a principal característica que diferencia as formas infantil (AEP tipo 1 e tipo 2) e juvenil (AEP3).

AEP tipo 1 (doença de Werdnig-Hoffman, MIM 253300) – apresenta o fenótipo mais grave de todas, com fraqueza muscular generalizada ao nascimento ou até os seis meses. A criança não chega a sentar, apresentando hipotonia e dificuldade na deglutição e amamentação. Em geral o óbito é decorrente da insuficiência respiratória até os dois anos de vida.

AEP tipo 2 (forma intermediária, MIM 253550) – com idade de início entre os três e dezoito meses e sobrevida variando entre os quatro anos até a adolescência. Em geral, a criança é capaz de sentar, embora não consiga andar sem amparo. A alimentação ocorre normalmente, embora alguns pacientes apresentem dificuldades na deglutição. O tremor fino nos dedos pode ser observado em alguns casos.

AEP tipo 3 (doença de Wohlfart-Kugelberg-Welander ou atrofia muscular espinhal juvenil, MIM 253400) – é a forma mais leve. Os pacientes desse grupo apresentam fraqueza dos músculos proximais e os sintomas têm início a partir dos dezoito meses até tardiamente na adolescência. Os pacientes com essa forma são capazes de ficar em pé e andar sozinhos, mas podem apresentar dificuldades em caminhar longas distâncias e/ou levantar. O tremor fino pode ser observado nos dedos.

#### 1.1.1. Bases genéticas da AEP tipo 1, 2 e 3

As três formas de amiotrofia espinhal progressiva (AEP tipo 1, AEP tipo 2 e AEP tipo 3) foram mapeadas no mesmo cromossomo, na região 5q11.2-q13.3 por Gilliam *et al.*, 1990 e Melki *et al.*, 1990. Utilizando a técnica de hibridização *in situ*, Mattei *et al.*, 1991 restringiram a região à 5q12.2-q13, mas foi somente em 1995 que Lefebvre *et al.*, descreveram elementos de 500 Kb duplicados e invertidos contendo vários genes dentro da região crítica da AEP.

Pequenas deleções, e mutações *missense*, *non-sense* e que afetam o sítio de *splicing* foram encontradas na cópia telomérica do gene de sobrevivência do neurônio motor (*survival of motor neuron SMN* ou *SMN1*), indicando que este é o gene responsável pela AEP. Mais de 90% dos

pacientes apresentam deleções nos exons 7 e 8 do gene SMN1, indicando a sua importância para o bom funcionamento da proteína.

O mecanismo molecular das atrofia muscular espinhais não é totalmente compreendido, pois a mesma mutação causa as três diferentes formas da doença.

#### 1.1.2. AEP tipo 4 (forma adulta)

A forma adulta da atrofia muscular progressiva é muito rara e em geral inicia-se ao redor dos 35 anos com progressão lenta e tem caráter autossômico dominante. Os músculos bulbares são raramente afetados.

A atrofia muscular espinhal do tipo Finkel foi reportada inicialmente por Richieri-Costa *et al.*, 1981; (MIM 182980).

Foram estudados duas famílias com aproximadamente 80 indivíduos com uma doença autossômica dominante de progressão lenta. Essa forma de amiotrofia espinhal tardia tem início ao redor dos 49 anos e progressão de 10 a 20 anos. Essa desordem é de origem neurogênica confirmada por eletroneuromiografia e biópsia muscular. Os pacientes apresentam fraqueza muscular progressiva, principalmente da musculatura proximal, com início nos membros inferiores e posteriormente envolvendo a musculatura dos membros superiores. Os reflexos estão ausentes e há fasciculação generalizada.

Uyama *et al.*, 2001, reportaram uma família japonesa com suspeita de amiotrofia espinhal tardia. O probando apresenta sinais característicos de AEP sem envolvimento do neurônio motor superior, entretanto apresenta relaxamento da musculatura do esfíncter. Não foram encontradas deleções nos exons 7 e 8 do gene SMN1.

#### 1.2. Esclerose lateral amiotrófica (ELA)

A E sclerose L ateral A miotrófica (ELA ou do inglês A myotrophic L ateral S clerosis – ALS) é conhecida como “Doença de Charcot” na França, “Doença do neurônio motor” no Reino Unido e “Doença de Lou Gehrig” nos EUA.

O termo **esclerose lateral** se refere ao endurecimento e cicatrização da porção lateral da medula espinhal decorrente da morte dos neurônios motores superiores e **amiotrófico** advém da fraqueza dos músculos, que se

tornaram atroficos devido à degeneração dos neurônios motores inferiores. Em geral, a doença ocorre preferencialmente em um dos lados do corpo, levando a uma fraqueza muscular assimétrica.

Estima-se que a incidência de ELA no mundo seja de aproximadamente 1:100.000. A Associação de Esclerose Lateral amiotrófica (ALSA) estima que haja mais de 30.000 americanos com essa doença. No Brasil, a Associação Brasileira de ELA (AbrELA) estima que a incidência seja de 1,5:100.000 indivíduos (2,5 brasileiros a cada ano).

Em geral, ocorre uma desproporção sexual, isto é, há mais homens que mulheres afetadas.

O diagnóstico clínico é baseado na avaliação neurológica associada a exames de eletroneuromiografia. Os critérios de diagnóstico foram estabelecidos pelo *El Escorial* (Brooks *et al.*, 2000) e pode ser resumido como:

- **ELA suspeita:** sinais de lesão do NMI em duas regiões.
- **ELA possível:** sinais do NMS e NMI em somente uma região ou sinais do NMS em até duas regiões ou sinais do NMI rostrais aos do NMS. Casos especiais: ELA monomélica, variantes da paralisia bulbar progressiva e esclerose lateral primária.
- **ELA provável:** sinais de NMS e NMI em duas regiões, com sinais de NMS acima dos sinais de NMI.
- **ELA definida:** sinais do NMS e NMI na região bulbar e pelo menos em duas regiões espinhais ou sinais do NMS e NMI em três regiões espinhais.

### 1.2.1. Os tipos de ELA

A ELA compreende um grupo de doenças clínica e geneticamente heterogêneas e com tempo de progressão dos sintomas muito variável. Existem várias formas de dividir esse grupo de patologias; dependendo dos

sinais clínicos e da idade de início dos sintomas, da variabilidade genética ou mesmo dependendo do tempo de progressão.

### **1.2.1.1. Classificação clínica baseada nas áreas do corpo primariamente afetadas**

#### **I. ELA de início bulbar**

Na ELA de início bulbar, os nervos da área bulbar do cérebro são inicialmente afetados, causando alteração na voz (rouquidão), disfagia, “lentificação” da fala e engasgos freqüentes e comprometimento do aparelho respiratório. Em geral, os pacientes com essa forma apresentam um quadro mais grave e com progressão rápida, pois há comprometimento das funções vitais.

#### **II. ELA de início nos membros**

Por outro lado, a ELA com início nos membros é a mais freqüente, sendo caracterizada pela perda inicial da musculatura dos membros, levando à atrofia e fraqueza muscular generalizada. Posteriormente os pacientes apresentam dificuldade de engolir e respirar. Fasciculação e câibras são sintomas constantes, tanto nas mãos e abdômen quanto nos pés. Os reflexos estão exaltados, e em alguns casos ocorre espasticidade e diminuição da sensibilidade. Geralmente a ELA tem início nos membros superiores, entretanto há casos em que o aparecimento dos sintomas se dá nos membros inferiores.

Independente dos sintomas iniciais, a ELA clássica apresenta todas as características descritas acima. Em geral, os pacientes falecem por insuficiência respiratória entre três e cinco anos após o início dos sintomas.

Existem, entretanto, algumas variantes clínicas (ELA atípica) associadas a comprometimento de outros sistemas, como o extrapiramidal, cerebelar, autonômico, sensório-motor ou cognitivo.

A ELA pode ainda ser subdividida em ELA do tipo familiar, esporádica e de Guam.

### **1.2.1.2. Classificação baseada no modo de herança**

#### **I. Casos familiares**

A forma familiar de ELA corresponde a aproximadamente 6% dos casos de ELA no Brasil e 5 – 10% dos casos no mundo. Esta forma de ELA apresenta um forte componente genético e será descrita com mais detalhes na seção 1.2.2.

As formas familiares podem ser de herança autossômica dominante ou recessiva e podem ser juvenis ou de adulto (Tabela 2).

#### **II. Casos isolados (esporádicos)**

Engloba a grande maioria dos casos no Brasil e no mundo inteiro.

Embora clinicamente os casos esporádicos e familiares sejam idênticos, algumas pequenas diferenças podem distinguir um do outro, como por exemplo, a idade de manifestação dos primeiros sintomas (casos esporádicos tendem a ocorrer mais tardiamente que os casos familiares).

Os casos esporádicos têm etiologia desconhecida, mas acredita-se que eventuais mutações ou polimorfismos nos genes envolvidos nas formas familiares aliados a um forte componente ambiental podem atuar como fatores de predisposição a ELA esporádica.

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento de ELA são: desempenhar atividade física intensa, sofrer algum tipo de trauma mecânico, ser vítima de um choque elétrico intenso e tabagismo.

#### **III. ELA Guam**

A ELA Guam (MIM 105500), também conhecida como “ELA do Pacífico Ocidental” é freqüente nos nativos Chamorro da ilha de Guam e também na península de Kii. Esta forma de ELA foi descrita no início do século XX como uma forma de ELA-*like*. A incidência de ELA Guam na década de 80 era de 7,5:100.000 por ano.

Na ELA Guam além dos sinais característicos da doença, os pacientes apresentam também associação com demência e mal de Parkinson. Há

grande sobreposição das duas doenças na mesma família, inclusive no mesmo indivíduo. Entretanto estudos de ligação falharam na identificação de um gene responsável por essa forma de ELA/Parkinson. Postulou-se então que algum fator ambiental local poderia ser o responsável pela patogênese da doença na população.

Observou-se que os indivíduos dessa região consomem grande quantidade de sementes de uma cicadácea (*Cycas circinalis*), que podem induzir a excitotoxicidade, talvez por imitação da ação do glutamato. Além disso, em experimentos laboratoriais, animais alimentados com a *Cycas* desenvolveram alterações clínicas e histopatológicas semelhantes a Parkinson-ELA-Demência de Guam.

As análises histopatológicas da ELA/Guam mostram emaranhados neurofibrilares semelhantes aos observados em pacientes com doença de Alzheimer.

Os emaranhados neurofibrilares são formados pela hiperfosforilação da proteína tau, que se deposita na célula nervosa. Mutações no gene *tau* (*MAPT - microtubule-associated protein tau*, MIM157140) causam uma forma autossômica dominante de demência fronto-temporal (MIM [600274](#)) e, portanto esse gene seria um bom candidato para a Parkinson-ELA-Demência de Guam.

Poorkaj *et al.*, 2001 encontraram desequilíbrio de ligação entre a doença de Guam e um polimorfismo no gene MAPT. Entretanto, os autores verificaram que esse gene não seria o principal responsável por essa patologia, mas atuaria como um gene modificador aumentando o risco de desenvolver ELA/Parkinson.

## 1.2.2. ASPECTOS GENÉTICOS

### I. Formas familiares

A ELA apresenta grande heterogeneidade genética e seu mecanismo não é muito bem compreendido, na medida em que os diferentes genes identificados não apresentam um único mecanismo comum.

Até o momento, nove locos foram mapeados para a forma familiar, mas somente quatro genes foram identificados.

A primeira forma foi mapeada no cromossomo 21 e foi denominada ELA1. As famílias apresentam padrão de herança autossômica dominante e forma adulta. A ELA2 representa uma forma familiar rara com padrão de herança autossômica recessiva juvenil.

Hentati *et al.*, 1994 observaram que várias famílias com as mesmas características da ELA1 não estavam ligadas ao mesmo loco no cromossomo 21 e este grupo foi denominado ELA3. Neste mesmo ano a ELA 4 foi mapeada.

Somente em 2002 um novo loco para as formas familiares com padrão de herança autossômico dominante do tipo adulto (ELA3) foi encontrado.

Outras formas dominantes e recessivas foram mapeadas (Tabela 2). As formas dominantes representam a grande maioria e seis dos sete tipos ocorrem em adultos.

As formas recessivas são raras e os sintomas aparecem na primeira ou segunda década de vida.

Tabela 2: Nove locos para a ELA familiar.

Cromossomo	locos	Modo de herança	gene	forma	Referência
21q	<i>ELA1</i>	AD	<i>SOD1</i>	adulto	Rosen <i>et al.</i> , 1993
2q33	<i>ELA2</i>	AR	<i>ALS2</i>	juvenil	Hadano <i>et al.</i> , 2001 Yang <i>et al.</i> , 2001
18q12	<i>ELA3</i>	AD	?	adulto	Hand <i>et al.</i> , 2002
9q34	<i>ELA4</i>	AD	<i>SETX</i>	juvenil	Chance <i>et al.</i> , 1998
15q	<i>ELA5</i>	AR	?	adulto	Hentati <i>et al.</i> , 1998
16q12	<i>ELA6</i>	AD	?	adulto	Ruddy <i>et al.</i> , 2003
20p13	<i>ELA7</i>	AD	?	adulto	Sapp <i>et al.</i> , 2003
20q	<i>ELA8</i>	AD	<i>VAPB</i>	adulto	Nishimura <i>et al.</i> , 2004
9q21	<i>ELA-FTD</i>	AD	?	adulto	Hosler <i>et al.</i> , 2000

AD = autossômico dominante, AR = autossômico recessivo, *SOD1*= *superóxido dismutase 1*, *ALS2*= *alsina*, *SETX* = *senataxina*, *VAPB* = *vesicle associated-membrane protein – associated protein B*

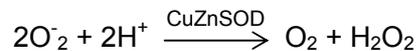
### I.1. ELA1

O primeiro loco mapeado foi denominado ELA1 [ALS1, (MIM, 105400)], localizado no cromossomo 21q e foi identificado por Siddique *et al.*, 1991. Posteriormente, Rosen *et al.*, 1993 identificaram o primeiro gene envolvido na ELA: o *superóxido dismutase 1 (SOD1)*, MIM [147450](#).

O gene da *SOD1* é pequeno, tem 5 exons e codifica uma proteína de 153 aminoácidos denominada Cobre-Zinco superóxido dismutase (CuZnSOD). Esta enzima é solúvel e é encontrada em praticamente todos os tecidos. Foram identificadas até o momento cinco variantes da *SOD1*, originadas por *splicing* alternativo, que podem ser tecido-específico, incluindo uma isoforma cerebral (Hirano *et al.*, 2000).

A CuZnSOD é a mais importante enzima antioxidante conhecida. Ela se localiza predominantemente no citosol, núcleo e mitocôndria. A *SOD1* é uma enzima homodimérica, de 32-KD e apresenta uma seqüência de aminoácidos altamente conservada, contendo subunidades de ligação a um íon de cobre e um íon de zinco. Estas subunidades são estabilizadas por uma ponte disulfeto entre cadeias associadas por forças não covalentes. As ligações com o cobre e o zinco são fundamentais para sua atividade biológica já que a perda do sítio de ligação ao cobre resulta em sua completa inativação.

A *SOD1* é responsável por catalisar a conversão de radicais livres, principalmente os ânions superóxido que são altamente reativos, a peróxido de hidrogênio.



Os radicais superóxido, também denominados espécies reativas de oxigênio (ERO ou ROS do inglês *reactive oxygen species*) são moléculas potentes e quimicamente seletivas, produzidas por todas as células aeróbicas (ver hipótese oxidativa 1.2.3.II).

Mutações no gene *SOD1* parecem exercer seus efeitos deletérios pelo ganho de função, mas também pela perda da atividade da enzima. A evidência mais convincente de ganho de função tóxica é o fato de animais transgênicos expressando a forma mutante de *SOD1* humano desenvolverem uma forma de DNM enquanto que a expressão do tipo selvagem não. Animais *knockout* que não expressam o CuZnSOD também não desenvolvem DNM. Nesses casos, os animais apresentam altos níveis da atividade do *SOD1* comparando com os não-transgênicos. Isso indica que

a doença não é causada por baixos níveis da atividade da SOD1, mas que a presença da enzima CuZnSOD mutante é tóxica para os neurônios motores.

A grande maioria das mutações encontradas nos casos familiares corresponde ao modo de herança autossômico dominante, com exceção da mutação, D90A, muito freqüente na população dos países escandinavos (Al-Chalabi *et al.*, 1998). Indivíduos heterozigotos para essa mutação nessa população não desenvolvem a doença.

Estudos utilizando marcadores polimórficos indicaram que esses indivíduos compartilham um haplótipo raro, tendo uma origem comum há mais de 895 gerações. A homozigose teria ocorrido um pouco mais tarde, há aproximadamente 63 gerações (Parton *et al.*, 2002).

Curiosamente essa mesma mutação foi encontrada em heterozigose em casos isolados do sul da Europa e foi considerada patogênica. Nestes indivíduos o quadro clínico parece ser mais grave do que o observado nos pacientes homozigotos da Escandinávia.

Em vista disso, Parton *et al.*, 2002 propuseram que algum polimorfismo regulador atuando em *cis* poderia estar localizado muito próximo do gene SOD1 nos indivíduos heterozigotos clinicamente normais, para a mutação D90A da Escandinávia. Esse polimorfismo seria um fator modificador e modularia a progressão e a gravidade da doença.

Mais de 100 mutações já foram identificadas no gene da SOD1, tanto em casos familiares como em casos esporádicos, apesar deste gene ter sido inicialmente relacionado à forma familiar. Todas as mutações encontradas nesse gene podem ser visualizadas no banco de dados disponível *online* (<http://alsod1.iop.kcl.ac.uk/>).

## **I.2. ELA2**

A ELA2 (ALS2, MIM [205100](#)) é uma forma juvenil com início entre 3 e 23 anos e modo de herança autossômico recessivo. Esta forma foi mapeada em 2q33-q35 por Hentati *et al.*, 1994.

Os pacientes apresentam espasticidade, comprometimento da fala, dos músculos faciais e dos membros, envolvimento pseudobulbar e amiotrofia das mãos e/ou músculos peroneais.

Em 2001, dois grupos independentemente (Yang *et al.*, e Hadano *et al.*, 2001) identificaram o gene responsável por esta forma de ELA. O gene foi denominado *Alsina (ALS2)* por Yang *et al.*, que estudaram duas famílias não aparentadas da Arábia Saudita e uma da Tunísia com diagnóstico de esclerose lateral primária.

Todas essas mutações encontradas são do tipo *frameshift* e o provável mecanismo de ação é a perda da função da proteína.

Mutações no gene da *alsina* também foram encontradas em crianças com o diagnóstico de paraplegia espástica grave. Foram identificadas mutações do tipo *frameshift* e *nonsense* (Eymard-Pierre *et al.*, 2002; Devon *et al.*, 2003; Lesca *et al.*, 2003).

A ALS2 é expressa em vários tecidos e células, incluindo neurônios do encéfalo e da medula espinhal. Dois transcritos foram identificados em vários tecidos com aproximadamente 6,5Kb e 2,6Kb. Essas isoformas foram denominadas forma longa (FL) e forma curta (FC), respectivamente. Ambas apresentam padrão de expressão similar, exceto no fígado, onde o transcrito menor é mais expresso.

Acredita-se que a *alsina* poderia atuar como um regulador/ativador de GTPases e poderia modular a ação dos microtúbulos, organização da membrana e tráfego intracelular.

Todas as mutações encontradas nesse gene podem ser visualizadas no banco de dados disponível *online* (<http://alsod1.iop.kcl.ac.uk/>).

### **I.3. ELA3**

O terceiro loco para a ELA familiar foi mapeado no cromossomo 18q21 por Hand *et al.*, 2002 (ALS3, MIM [606640](#)).

A ELA3 foi mapeada em uma grande irmandade de origem europeia com uma forma clássica de herança autossômica dominante adulta.

Clinicamente os sinais se mantêm uniformes em todos os indivíduos afetados dessa família. Essa forma de ELA tem início nos membros inferiores ao redor dos 45 anos, com duração média de 5 anos. A apresentação clínica é típica de ELA com fraqueza progressiva nos quatro membros e

envolvimento bulbar, com sinais de comprometimento dos NMS e NMI. Não há relatos de dor, demência, sinais sensoriais ou degeneração cerebelar.

Após exclusão de mutação no gene SOD1, teve início um estudo de mapeamento genético. O máximo LOD score obtido foi de 4,5 próximo ao marcador D18S39 em uma região de aproximadamente 7,5 cM (8Mb) flanqueada pelos marcadores D18S846 e D18S1109. Essa região contém aproximadamente 50 genes, dos quais 13 são conhecidos. Os demais são preditos.

Até o momento não foi identificado o gene causador da forma ELA3.

#### **I.4. ELA4**

A ELA tipo 4 (ALS4, MIM [602433](#)) foi descrita pela primeira vez como uma forma de Charcot-Marie-Tooth (CMT; MIM [118200](#)) em 1964. Os dados históricos datam do século 17 na Inglaterra.

Em 1998, Chance *et al.*, descreveram essa doença como sendo uma forma juvenil de esclerose lateral amiotrófica, com padrão de herança autossômica dominante e com progressão lenta e mapearam um novo gene em 9q34.

Inicialmente os pacientes apresentam dificuldade em caminhar longas distâncias, seguido de fraqueza e perda da musculatura das mãos e extremidades distais associados aos sinais piramidais. Ao redor da quarta ou quinta década de vida, os pacientes apresentam significativa fraqueza proximal e podem necessitar de cadeira de rodas. Na sexta década, eles perdem a habilidade com as mãos. Os músculos bulbares estão preservados. A grande maioria dos pacientes apresenta fraqueza e atrofia muscular distal.

Blair *et al.*, 2000 restringiram a região a aproximadamente 3 cM flanqueados pelos marcadores D9S149 e D9S1198. O mapeamento físico revelou que essa região abrange aproximadamente 500 Kb.

De Jonghe *et al.*, 2002 estudaram três famílias não relacionadas, com o diagnóstico de neuropatia hereditária motora distal (NMHD) com características piramidais mapeadas na mesma região da ELA4. Estas famílias são provenientes da Bélgica, da Áustria e Inglaterra. Observou-se

fraqueza e atrofia muscular de modo ascendente, isto é, inicialmente nos membros inferiores e posteriormente nos membros superiores. Embora os autores tenham diagnosticado essa forma como uma neuropatia motora distal, o grupo não exclui a possibilidade de esta doença estar relacionada com a ELA4.

Chen *et al.*, 2004 identificaram mutações no gene *senataxina* (*SETX*, MIM 608465) nas famílias com o diagnóstico de ELA4 e NMHD. Além disso, verificaram que uma das três famílias com diagnóstico de NMHD não apresentou mutação no gene *SETX*. Os autores afirmam que a sobreposição fenotípica observada nas famílias estudadas (neuropatia motora familiar, paraplegia espástica hereditária, polineuropatia periférica hereditária) pode complicar a classificação clínica. Independente da nomenclatura da doença, os autores proadvmvaram que mutações no gene *SETX* causam uma disfunção motora importante.

Além disso, mutações nesse gene podem causar a ataxia apraxia oculomotora tipo 2 (AOA2, MIM 606002) (Moreira *et al.*, 2004).

A AOA é um grupo de doenças geneticamente heterogêneas com padrão de herança autossômica recessiva, caracterizada por ataxia e atrofia cerebelar, apraxia oculomotora, perda precoce dos reflexos e neuropatia periférica tardia.

Embora a ELA4 e a AOA2 pertençam a dois grupos de doenças distintas em relação ao modo de herança e ao fenótipo, ambas causam neuropatia periférica motora com progressão lenta e um comprometimento motor grave (Chen *et al.*, 2004).

Os autores especulam que diferentes tipos de mutação podem dar origem a mecanismos de ação distintos causados pela perda ou ganho de função, causando AOA2 ou ELA4.

O gene *SETX* codifica uma proteína de 302,8 kD. Embora sua função seja desconhecida, a proteína contém um domínio DNA/RNA helicase com forte homologia a dois genes que codificam proteínas envolvidas no processamento do RNA. Os autores sugerem que mutações no gene da *SETX* podem causar degeneração neuronal por disfunção na atividade da helicase ou no processamento do RNA.

### **I.5. ELA5**

A ELA5 (ALS5, MIM [602099](#)) é uma forma autossômica recessiva e representa a grande maioria das famílias com padrão de herança recessiva de populações do norte da África, Sul da Ásia e Europa (Hentati *et al.*, 1998). Este estudo foi realizado em sete famílias (quatro da Tunísia, duas do Paquistão e uma da Alemanha).

Os pacientes da Tunísia e do Sul da Ásia apresentam idade de início entre oito e dezoito anos com dificuldades em caminhar e fraqueza muscular. Foi observado amiotrofia das mãos e pernas. Alguns pacientes apresentaram sintomas bulbares de moderados a graves, incluindo fasciculação e atrofia da língua, em geral após três ou quatro anos após o início dos sintomas. Os pacientes com o quadro mais avançado apresentaram sintomas bulbares e pseudobulbares graves. A doença é de progressão lenta com sobrevida de mais de dez anos.

Aparentemente o quadro clínico destas famílias estudadas é indistinguível, com exceção da família alemã. O estudo de ligação revelou uma região comum no cromossomo [15q15.1-q21.1](#) compartilhada por quatro destas famílias sugerindo uma possível heterogeneidade genética.

O gene responsável pela ELA5 está localizado em uma região de aproximadamente 6 cM. Além disso, os autores sugerem que um terceiro loco deva existir para a forma autossômica recessiva de ELA.

Até o momento o gene não foi identificado.

### **I.6. ELA6**

A ELA6 (ALS6, MIM 608030) foi mapeada no cromossomo 16q12 por três grupos independentemente.

Sapp *et al.*, 2003 estudando 16 famílias com uma forma familiar adulta de ELA e sem mutação no gene SOD1 iniciaram a triagem genômica. Na família 1 esse grupo identificou um novo loco denominado ELA6 em uma região de aproximadamente 51 cM (38 Mb). A análise *LOD score* revelou o valor de 3,29 em D16S403. Nessa família a idade de início foi ao redor dos 67 anos e a duração da doença de aproximadamente 2,1 anos.

Abalkhail *et al.*, 2003 foram o segundo grupo a mapear essa forma de ELA no cromossomo 16q12.1-q12.2 em famílias do Reino Unido. Mutações no gene SOD1 foram previamente excluídas antes do início da triagem genômica. Esse grupo conseguiu refinar a região a aproximadamente 14,74cM (6,6Mb) entre os marcadores D16S409-D16S3032, coincidindo com a região encontrada por Sapp e colaboradores.

Finalmente, Ruddy *et al.*, 2003 realizaram o mapeamento da ELA tipo 6 em duas grandes famílias européias. Novamente mutações no gene da SOD1 foram excluídas. O valor máximo do LOD score foi 3,62 no marcador D16S3137. Eventos de recombinação restringiram a região a aproximadamente 10,1cM (4,5Mb) entre os marcadores D16S3396 e D16S3112.

Análises de bioinformática revelaram que essa região contém 18 genes conhecidos e mais de 70 genes preditos.

Os três grupos estão procurando o gene responsável pela ELA tipo 6 e até o momento nada foi encontrado.

### **I.7. ELA7**

Esta forma de ELA (ALS7, MIM [608031](#)) foi mapeada por Sapp *et al.*, 2003. Nessa irmandade o DNA de 28 indivíduos foi analisado, dos quais dois são afetados pela doença. O valor de LOD score máximo foi 3,0, encontrado próximo aos marcadores D20S103 e D20S117. Os dois irmãos compartilham uma região de aproximadamente 1Mb na porção terminal do braço curto do cromossomo 20, contendo de 20-24 genes conhecidos.

Os autores ainda reforçam a idéia de novos genes envolvidos na patologia da ELA, já que somente 2 das 16 famílias estudadas têm uma região mapeada.

### **I.8. ELA/DFT**

A ocorrência de esclerose lateral amiotrófica pura ocorre na grande maioria das vezes, entretanto em menos de 5% dos casos, a ELA pode ocorrer simultaneamente com outros fenótipos neurodegenerativos como, por

[exemplo, a demência fronto-temporal \(ALS/DFT, MIM 105550\) ou outras síndromes extrapiramidais, corticais ou subcorticais \(Hosler \*et al.\*, 2000\).](#)

Observou-se que a DFT foi caracterizada por comportamento impulsivo e social inapropriado, além da deterioração da capacidade de realizar atividades rotineiras. A mudança de comportamento mudou antes de qualquer alteração de memória significativa. Estudos de neuroimagem revelaram atrofia fronto-temporal importante.

Hosler *et al.*, 2000 mapearam o novo gene relacionado a ELA/DFT em 9q21-q22 com um *LOD score* máximo de 3,15 em D9S922.

[Até o momento não foi identificado um gene responsável pela ALS/DFT.](#)

## **II. Formas esporádicas**

Aproximadamente 90% dos casos de ELA são esporádicos podendo ser considerada uma doença complexa ou multifatorial. Além do componente ambiental já mencionado, há indícios de que vários genes podem estar relacionados com um aumento na susceptibilidade ou na modulação no quadro de ELA esporádica. Entretanto, como em quase todos os estudos de associação, os resultados são controversos, indicando que vários genes podem estar envolvidos em maior ou menor grau na patologia da ELA.

Além do gene da SOD1, outros genes, cujo mecanismo molecular não é bem compreendido, estão envolvidos nessa forma da doença e serão discutidos a seguir.

### **II.1. Neurofilamentos**

Os neurofilamentos são filamentos intermediários das células e um dos principais componentes do citoesqueleto neuronal.

Os neurofilamentos apresentam três subunidades: cadeia leve (NEFL), cadeia média (NEFM) e cadeia pesada (NEFH; MIM 162230).

Mutações nas diferentes subunidades dos neurofilamentos foram identificadas em várias doenças neurológicas, como por exemplo, NEFH e ELA, NEFM e mal de Parkinson e NEFL e doença de Charcot-Marie-Tooth.

Estas mutações levam ao acúmulo de proteína, mas os mecanismos de como os neurofilamentos se acumulam nessas doenças neurodegenerativas permanecem desconhecidos. Entretanto, sabe-se que os neurofilamentos são sintetizados no corpo celular dos neurônios e então transportados através dos axônios. Qualquer alteração nessa via de transporte intracelular poderia levar a um acúmulo de proteína e conseqüentemente um estrangulamento axonal e morte do neurônio motor.

Al-Chalabi *et al.*, 1999 encontraram deleções e inserções no gene NEFH em pacientes com ELA do Reino Unido e dos países escandinavos.

Modelos animais transgênicos superexpressando os neurofilamentos apresentaram uma forma de doença do neurônio motor e o primeiro sinal observado foi o acúmulo de neurofilamentos e alterações no transporte axonal nesses animais. (Collard *et al.*, 1995; Julien *et al.*, 1998; Rao *et al.*, 2003).

Todas as mutações encontradas nesse gene podem ser visualizadas no banco de dados disponível *online* (<http://alsod1.iop.kcl.ac.uk/>).

## II.2. Periferina

A periferina (MIM 170710) assim como os neurofilamentos é um filamento intermediário do tipo 3 presente no citoesqueleto dos neurônios.

Beaulieu *et al.*, 1999 verificaram em camundongos transgênicos que a super-expressão da periferina leva a uma degeneração seletiva dos axônios motores, sugerindo que essa proteína poderia estar envolvida na patologia da ELA.

Gros-Louis *et al.*, 2004 encontraram 18 polimorfismos no gene *periferina* em pacientes com ELA esporádica e familiar. Duas variantes (uma inserção no intron 8 e uma deleção de um nucleotídeo no exon 1 resultando numa proteína truncada) foram encontradas em pacientes, mas não em 380 controles; indicando que esse gene quando mutado pode estar relacionado com a ELA.

### II.3. Fator neurotrófico ciliar

O fator neurotrófico ciliar (CNTF, MIM 118945) é um potente fator trófico de sobrevivência para os neurônios e oligodendrócitos e pode estar relacionado com a diminuição da destruição dos tecidos durante os ataques inflamatórios.

Ele é expresso nas células da glia, nos nervos periféricos e no sistema nervoso central.

Giess *et al.*, 2002 reportaram que um homem na idade de 25 anos, sofria de uma forma típica de ELA familiar com progressão de aproximadamente 11 meses. Observou-se que esse indivíduo apresentava uma mutação no gene SOD1. Essa mesma mutação foi encontrada em dois irmãos sem sintomas e em sua mãe, que não desenvolveu a doença até os 54 anos. Sua avó materna e sua bisavó faleceram com fraqueza e atrofia muscular na idade de 62 e 50 anos respectivamente.

Foram estudados vários genes modificadores para a ELA e uma mutação adicional em homozigose no gene CNTF foi encontrada no probando, estando ausente na sua irmã normal.

Esses autores estudaram ainda pacientes com a forma esporádica de ELA, que além de mutações no SOD1 apresentavam também mutações em homozigose no gene CNTF. Curiosamente eles verificaram que essa combinação favorece o aparecimento dos sintomas mais precocemente nesses indivíduos do que os que só tinham a mutação no SOD1.

Além disso, para corroborar a hipótese do envolvimento do CNTF, os autores estudaram camundongos que apresentavam a mutação G93A no gene SOD1 e ausência da proteína CNTF. Verificou-se que esses animais desenvolveram uma forma de doença do neurônio motor mais precocemente que os animais com uma única mutação.

Com base nesses resultados, foi sugerido que o CNTF atuaria como gene modificador levando a um início precoce em pacientes que já apresentam mutação no gene SOD1.

Em contrapartida, Al-Chalabi *et al.*, 2003 estudaram 400 pacientes (351 com a forma esporádica e 49 com a forma familiar) e 236 controles. Os

[autores não verificaram diferença no quadro clínico, idade de início ou progressão da doença nos pacientes com uma ou duas cópias do alelo nulo, sugerindo então que o CNTF não é um fator modificador importante para ELA.](#)

#### **II.4. Apolipoproteína E**

A apolipoproteína E (ApoE, MIM 107741) é uma proteína importante que está relacionada com o metabolismo das lipoproteínas incluindo o colesterol.

Três isoformas comuns na população são encontradas: a ApoE- $\epsilon$ 2 é a menos freqüente e seria um fator de proteção ao desenvolvimento da doença de Alzheimer (DA); a ApoE- $\epsilon$ 3 que é a mais freqüente na população e a ApoE- $\epsilon$ 4, que estaria envolvida em diferentes patologias. Elas diferem na troca do aminoácido cisteína para arginina em duas regiões, no resíduo 112 (denominado sítio A) e resíduo 158 (sítio B).

A ApoE é o fator de susceptibilidade mais conhecido para a doença de Alzheimer, entretanto parece estar envolvida em outras doenças como, por exemplo, doenças coronárias, hiperlipidemia, diabetes e ELA.

Na DA, a ApoE- $\epsilon$ 4 auxiliaria no depósito da proteína beta amiloide, principal componente das placas amilóides (placas senis), além de atuar na sinalização intracelular, interagir com a proteína associada ao microtúbulo, atuar no metabolismo da glucose e no estresse oxidativo.

Em vista disso, estudos de associação têm sido realizados na tentativa de se relacionar a ApoE com a ELA. Drory *et al.*, 2001 encontraram resultados positivos, o que não foi verificado por Siddique *et al.*, 1998. Lacomblez *et al.*, 2002 também não encontraram associação entre o alelo  $\epsilon$ 4 e a ELA, entretanto os níveis plasmáticos de ApoE estavam maiores nos pacientes que nos controles.

O mecanismo pelo qual a ApoE estaria envolvida na ELA não é conhecido.

#### **II.5. Fator de crescimento vascular endotelial**

O fator de crescimento vascular endotelial (*vascular endothelial growth factor* – VEGF ou Vegfa) é o maior regulador da formação (angiogênese) e da permeabilidade dos vasos sanguíneos durante o desenvolvimento normal e na resposta a mudanças metabólicas do organismo (Skene e Cleveland, 2001).

O VEGF está envolvido em diversas doenças como, por exemplo, diabetes e neuropatia isquêmica, mal de Parkinson, doença de Alzheimer e esclerose múltipla (Storkebaum *et al.*, 2004).

Como que por acaso, Oosthuysen *et al.*, 2001 utilizando modelos animais, associaram o VEGF com a ELA. O promotor do VEGF apresenta uma região conhecida como elemento de resposta a hipóxia (*hypoxia response element* – HRE). Sabe-se que a hipóxia é o estímulo mais importante que regula a expressão do VEGF e que restaura a entrega do oxigênio estimulando a angiogênese e a perfusão tecidual. Observou-se que quando essa região está deletada, os níveis basais de VEGF são mantidos, contudo ocorre uma deficiência pronunciada na capacidade do VEGF responder à hipóxia. Os animais morrem precocemente ou logo após o nascimento, quando comparado ao grupo controle. Além disso, eles apresentam um profundo déficit motor entre o quinto e o sétimo mês de vida, além de sinais característicos de modelos animais para a esclerose lateral amiotrófica: acúmulo de filamentos na medula espinhal e no tronco cerebral, degeneração e desnervação dos axônios motores devido à atrofia muscular. Somente os neurônios motores são afetados.

Os autores acreditam que a deleção do HRE produz um déficit na perfusão vascular e uma incapacidade dos neurônios ou células da glia de produzir VEGF, que poderia proteger os neurônios motores dos danos da hipóxia. Esses resultados sugerem que o VEGF atue não somente nas células endoteliais vasculares como também nos neurônios como fator neurotrófico ou de neuroproteção (Oosthuysen *et al.*, 2001; Skene e Cleveland, 2001).

Adicionalmente, alguns pesquisadores têm sugerido que o VEGF pode atuar no crescimento, desenvolvimento e na estabilidade dos neurônios

regulando as proteínas neuronais que estão associadas ao microtúbulo (Lambrechts *et al.*, 2004).

Não se sabe por que os neurônios motores são seletivamente afetados com a baixa expressão do VEGF. Postula-se que os NM sejam mais vulneráveis aos radicais livres que são gerados durante a isquemia e a hipóxia (Lambrechts *et al.*, 2004).

Os NM são as maiores células do corpo humano e seu volume pode ser 5000 vezes maior que o da maioria das células, podendo também ser as mais compridas (chegando a um metro de comprimento). Adicionalmente, estes neurônios mantêm uma alta taxa metabólica e de disparos elétricos, consumindo grande quantidade de energia para manter as bombas de íons e restaurar o potencial elétrico das células após um potencial de ação. A diminuição da perfusão vascular com a idade talvez possa contribuir também para a vulnerabilidade seletiva do NM (Skene e Cleveland, 2001; Lambrechts *et al.*, 2004; Storkebaum *et al.*, 2004).

Com a descoberta do envolvimento do VEGF na ELA em modelos animais, diversos pesquisadores buscaram encontrar evidências do envolvimento desse gene na doença em pacientes com ELA.

Lambrechts *et al.*, 2003 realizaram um estudo englobando 1900 pacientes portadores de ELA do tipo familiar e esporádico de três regiões da Europa (900 da Suécia e 1000 da Bélgica e de Birmingham). Os autores observaram que indivíduos homocigotos para o haplótipo AAG e AGG para três polimorfismos localizados no promotor e na região 5' não traduzida [5' *untranslated region*, 5'UTR (-2578 C/A, -1154 G/A e -634 G/C)] apresentam 1,8 vezes mais chances de desenvolver a ELA (P=0,00004). Essa combinação polimórfica diminui a expressão do VEGF para 41% e 30% respectivamente, quando comparado com o haplótipo CGC.

Lambrechts *et al.*, 2003 dosaram os níveis de VEGF iniciais nos pacientes europeus com ELA e observaram que os níveis desta enzima estavam normais. Não foi encontrada nenhuma correlação com a idade de início e não é sabido se os níveis de VEGF alteram a progressão da doença.

Os pacientes portadores de ELA sofrem de hipóxia devido à insuficiência respiratória que ocorre geralmente nos estágios finais da

doença. Os autores afirmam que seria interessante dosar esses níveis de acordo com o estágio da doença.

Nesse mesmo trabalho, o grupo estudou modelos animais para a ELA com a mutação G93A no gene da SOD1. Eles verificaram que os animais que apresentam a mutação G93A e a deleção do HRE neste gene apresentam uma fraqueza muscular precoce devido à perda dos NM e uma redução no tempo de vida. Os autores administraram VEGF em animais submetidos à hipóxia e verificaram que houve uma considerável recuperação motora, sugerindo que esta proteína apresentaria um potencial poder terapêutico.

Entretanto, o VEGF não está disponível para tratamento para pacientes com ELA porque ele é rapidamente degradado pelo organismo e está presente naturalmente no corpo humano. Os autores ressaltam que outros estudos devem ser realizados antes de utilizá-lo na terapia para a ELA e que o maior desafio seria como levar o VEGF diretamente aos neurônios motores. Uma das alternativas sugeridas seria o uso de vetores virais.

Azzouz *et al.*, 2004 desenvolveram uma forma de terapia para a ELA utilizando um sistema de transferência gênica com o uso de vetores lentivirais diretamente nos neurônios. Os autores utilizaram como modelo o camundongo com a mutação SOD1<sup>G93A</sup> e testaram a eficiência da transferência gênica antes dos primeiros sintomas de degeneração do NM. Eles verificaram que os animais que foram tratados com o VEGF tiveram um aumento na expectativa de vida de 38 dias (~30%). Além disso, os animais tratados tiveram um retardo do início e da progressão da doença. Os níveis de VEGF dentro da coluna espinhal nos estágios finais da doença foram significativamente maiores que nos animais não tratados. Os dados sugerem que o tratamento com o uso de vetores lentivirais por meio de transporte retrógrado foi eficiente e que o VEGF é um potente fator de neuroproteção.

Storkebaum *et al.*, 2005 verificaram uma outra forma de terapia com o uso de VEGF. Esses autores utilizaram os mesmos modelos animais anteriormente estudados, entretanto com transferência intracerebroventricular por meio de transporte anterógrado. O grupo obteve sucesso no tratamento e a expectativa de vida aumentou 22 dias.

### 1.2.3. HIPÓTESES PARA A ELA

Hoje existem inúmeras hipóteses para se explicar o mecanismo patológico responsável pela ELA. Dentre elas estão a excitotoxicidade, estresse oxidativo, acúmulo de proteínas, deficiência em proteínas envolvidas no transporte axonal, exposição a reagentes tóxicos e exposição a metais pesados como o chumbo, mercúrio e alumínio.

As quatro principais hipóteses aceitas para se explicar a patologia da ELA estão representadas na figura 2.

#### I. Excitotoxicidade

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, em especial do sistema motor, sendo responsável por 75% das transmissões excitatórias neurais.

Esse aminoácido está presente nos alimentos e é importante na transmissão rápida (resposta rápida ao estímulo), cognição, memória, movimento e sensibilidade.

Existem dois tipos de transportadores de glutamato, o transportador excitatório de aminoácido 1 (*excitatory amino acid transporters 1* – EAAT1) e o transportador excitatório de aminoácido 2 (EAAT2).

Aproximadamente 60-70% dos pacientes com a forma esporádica da ELA tem de 30-90% de perda do transportador de glutamato EAAT2 astrogliial. Postula-se que a disfunção no transporte axonal resulta na diminuição da recaptção do glutamato por alterações nestes receptores. Dessa forma, o glutamato que foi liberado pelo axônio na fenda sináptica não é reciclado e ocorre uma estimulação constante do neurônio (excitotoxicidade), causando a liberação incessante de enzimas degradativas dentro do neurônio. Assim, o excesso de glutamato leva à superestimulação dos receptores de glutamato não-NMDA e NMDA (*N-methyl-D-aspartic acid*) podendo resultar em grande influxo de cálcio na célula (Figura 3).

Sabe-se que o cálcio é essencial para o metabolismo celular, atuando como segundo mensageiro na sinalização intracelular. Entretanto quando em excesso pode levar à produção excessiva de radicais livres, ativação de proteases, fosfolipases e endonucleases bem como à ativação de vias da

morte celular, apoptose. Consequentemente os neurônios cerebrais e da coluna espinhal podem morrer.

Com a descoberta da excitotoxicidade, foi possível descobrir uma droga que retarda a liberação do glutamato das células nervosas, o Riluzole. Este é o único medicamento liberado para o tratamento da ELA (ver seção tratamento 1.2.4.).

## II. Hipótese Oxidativa

Acredita-se que aliado à excitotoxicidade, o estresse oxidativo atuaria na morte dos neurônios motores em ELA.

Os radicais livres são os principais componentes da hipótese oxidativa. Eles representam qualquer átomo, molécula ou íon que possui um ou mais elétrons livres na sua órbita externa. Esses radicais são altamente instáveis e podem gerar danos irreparáveis no DNA, contribuindo para o aparecimento do câncer e o envelhecimento precoce.

Os EROS, como por exemplo, o óxido nítrico (NO), superóxido ( $O_2^-$ ) e o hidroxil ( $OH^-$ ) são altamente reativos e podem causar danos celulares em diversas doenças incluindo a ELA.

Os radicais livres estão presentes na poluição atmosférica, na radiação solar, em substâncias químicas e em pesticidas. Entretanto o nosso organismo também é capaz de produzi-los.

Aproximadamente 95% do oxigênio proveniente da respiração aeróbica são neutralizados pela cadeia respiratória celular, cujo produto final é transformado em água, ocorrendo liberação de energia. Entretanto os 5% restantes formam radicais livres. Se esses radicais não forem adequadamente combatidos, ou se estiverem sendo formados em excesso, podem ser prejudiciais ao organismo, pois causam a perda da integridade e do potencial de membrana, inativação enzimática e degradação protéica. Além disso, estes radicais podem aumentar a permeabilidade da membrana ao cálcio e aos íons metálicos, causando danos celulares como apoptose e morte celular.

Mutações no gene SOD1 podem levar a um mau funcionamento da proteína e conseqüentemente a um aumento na produção de radicais livres. Por outro lado, a excitotoxicidade ao glutamato pode acelerar esse processo.

Os antioxidantes inibem a oxidação dos radicais livres e hoje existem vários tipos como as enzimas SOD1, catalase, glutathione peroxidase e glutathione transferase. Vitaminas como o beta caroteno, carotenóides, Vitamina C, E e suplementos alimentares como a coenzima Q10, ácido úrico, ácido cítrico e málico e melatonina também atuam como antioxidantes. O uso dessas substâncias poderia contribuir como forma de tratamento para a ELA.

### III. Acúmulo de proteínas e estrangulamento axonal

Uma outra hipótese aceita para se explicar a patologia da ELA é o acúmulo anormal de proteínas associadas ao estrangulamento axonal.

As inclusões protéicas ou corpos de inclusão são freqüentemente observados em doenças neurodegenerativas, como por exemplo, na doença de Alzheimer (depósito da proteína beta-amilóide, produzindo as placas amilóides) e no mal de Parkinson (acúmulo de alfa-sinucleína, produzindo os corpos de Lewy).

Na ELA pode-se observar alterações histopatológicas como o acúmulo de proteínas como a SOD1, neurofilamentos e corpos de inclusão inespecíficos.

Mutações na SOD1 podem alterar o dobramento da proteína formando as inclusões protéicas, que podem ser tóxicas para as células. Essas inclusões podem ser observadas tanto em pacientes portadores das mutações G93A, G85R e G37R quanto em animais transgênicos portadores das mesmas mutações (Bruijn *et al.*, 1998).

Os mecanismos pelos quais essas inclusões são formadas ainda permanecem desconhecidos. Qualquer alteração em proteínas envolvidas na via de transporte intracelular (incluindo proteínas transportadoras como a dineína, microtúbulos e neurofilamentos) poderia levar a um acúmulo anormal de proteína e conseqüentemente a um estrangulamento axonal. Não se sabe se esse acúmulo é causa ou conseqüência da morte dos NM, mas sabe-se que quando ocorre um bloqueio na célula, isto irá alterar o transporte

de proteínas através do axônio gerando o estrangulamento axonal. Isto priva algumas regiões de receber suprimento para a sua sobrevivência e conseqüentemente o neurônio motor morre.

#### **IV. Exposição a reagentes tóxicos**

Indivíduos que estão expostos a reagentes químicos utilizados na agricultura (fertilizantes e pesticidas) têm um risco maior de desenvolver ELA.

A grande maioria desses reagentes é lipofílica, isto é, são atraídos por lípidos que compõem as membranas celulares. Essas substâncias são capazes de se difundirem no cérebro através das membranas celulares causando sintomas neurológicos.

A grande maioria dos pesticidas apresenta neurotoxinas (toxinas que afetam o sistema nervoso) que em geral não possuem cheiro e podem causar os primeiros sintomas semanas após a exposição.

Os soldados que participaram da “Operação Tempestade no Deserto” sofreram forte exposição a reagentes químicos tóxicos e muitos deles desenvolveram a ELA. Não se sabe ainda qual reagente foi o causador da doença em pelo menos 28 soldados participantes da Guerra do Golfo.

#### **V. Exposição a metais pesados**

Após a descoberta da ELA Guam, muitos se questionaram quais seriam os fatores ambientais que poderiam atuar na patogênese da ELA. Os moradores das regiões próximas de Guam eram expostos a grandes quantidades de metais pesados como chumbo, mercúrio e alumínio. O acúmulo desses metais talvez possa levar a manifestação dos sintomas de ELA.

A toxicidade ao chumbo é causada pela sua afinidade à membrana celular e mitocondrial, interferindo na ação de diversas enzimas.

Em adultos, o envenenamento por chumbo causa dor abdominal, fadiga, anemia, sintomas neurológicos, irritabilidade, dor de cabeça, neuropatia motora periférica, perda de memória e de concentração.

A exposição ao mercúrio ocorre pela ingestão de alimentos contaminados, como o peixe, por exemplo. A exposição ao mercúrio leva ao tremor, delírio, insônia, perda de memória. A neurotoxicidade resultante do acúmulo de mercúrio é caracterizada pela parestesia, “lentificação” da fala, fraqueza muscular, irritabilidade, depressão.

Depósitos de alumínio e cálcio foram encontrados nos neurônios de pacientes com ELA Guam.

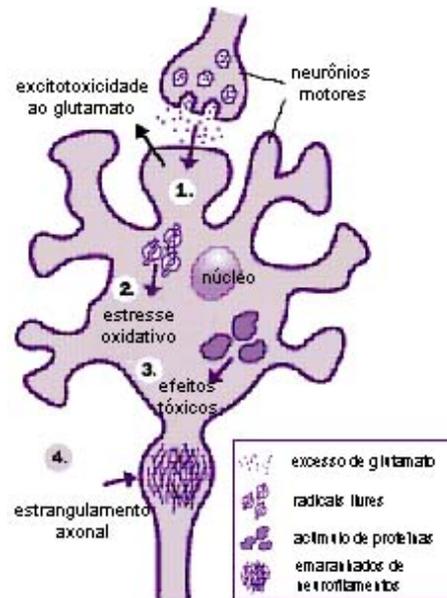


Figura. 2: Hipóteses aceitas para a patogênese da esclerose lateral amiotrófica. 1 - Excitotoxicidade pelo glutamato, 2 - estresse oxidativo, 3 - acúmulo de proteínas e 4 - estrangulamento axonal. Ver texto para mais detalhes. Modificado de [http://www.mdausa.org/publications/als/als4\\_6motorn.html](http://www.mdausa.org/publications/als/als4_6motorn.html)

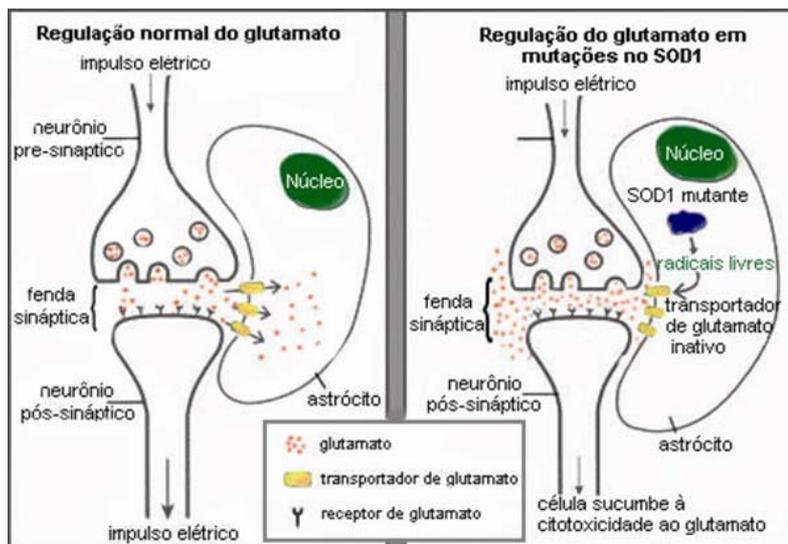


Figura. 3: Atuação do glutamato e do transportador de glutamato em indivíduos normais (esquerda) e em pacientes com ELA e mutações no gene SOD1 ou nos transportadores de glutamato. Adaptado de [http://www.mdausa.org/publications/als/als4\\_3.html](http://www.mdausa.org/publications/als/als4_3.html)

#### 1.2.4. TRATAMENTO

A ELA é uma doença neurodegenerativa, progressiva e até o momento incurável.

Atualmente existe tratamento para evitar a progressão da doença e para amenizar os sintomas, como a fraqueza muscular, disfagia e a insuficiência respiratória. Recomenda-se a fisioterapia e a hidroginástica que auxiliam na manutenção do tônus muscular, prevenindo a rigidez muscular (contraturas). Os pacientes que apresentam dificuldades de deglutição devem ser alimentados cuidadosamente evitando o engasgo com os alimentos e em casos mais graves, os pacientes são alimentados com o auxílio de um tubo de gastrostomia. Os problemas respiratórios podem ser diminuídos com o uso da ventilação assistida e de aparelhos como o Bipap.

Alguns remédios podem ser utilizados como paliativos para os sintomas como, por exemplo, drogas que diminuem os espasmos musculares e aliviam algumas vezes as câibras musculares.

Alguns pacientes apresentam envolvimento pseudobulbar e o uso de antidepressivo auxilia no combate desses sintomas.

O uso de creatina tem demonstrado certa eficácia, pois ela auxilia os neurônios motores a produzir energia necessária para sua sobrevivência. A creatina é o suplemento alimentar mais utilizado por atletas.

O único medicamento indicado para o combate da ELA é o RILUTEK® (riluzole), que foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration* - Agência de Alimentos e Fármacos dos EUA). O Rilutek é membro dos benzotiazole e sua fórmula molecular é  $C_8H_5F_3N_2OS$ .

O modo de ação deste medicamento é desconhecido. Sabe-se, entretanto que esse remédio foi originalmente desenvolvido como um anti-convulsivante, mas demonstrou-se que ele tem efeitos bloqueadores da neurotransmissão glutamatérgica.

Além disso, o Rilutek parece inativar os canais de sódio dependentes de voltagem e tem a capacidade de interferir na sinalização intracelular. Observou-se também que esse medicamento retarda a progressão da doença em modelos animais transgênicos com mutações no gene SOD1, e em cultura de neurônios motores de rato, foi observado que o medicamento evita a morte neuronal.

Em estudos realizados em pacientes e controles, o medicamento parece retardar a progressão da doença. Entretanto, alguns pacientes não respondem bem ao medicamento apresentando efeitos colaterais. Outras vezes o paciente não apresenta nenhuma alteração envolvendo o glutamato e, portanto não haverá resposta ao medicamento.

Mais detalhes quanto à ação do riluzole pode ser encontrado no site da *Aventis Pharmaceuticals Products Inc* ([http://www.aventispharmaceutical.com/PIs/rilutek\\_TXT.html](http://www.aventispharmaceutical.com/PIs/rilutek_TXT.html)).

Outras formas de terapia têm sido testadas com o intuito de tratar a ELA.

O uso de antioxidantes poderia combater o excesso de radicais livres e aparentemente os efeitos parecem ser benéficos. As vitaminas C e E são as mais utilizadas.

### 1.3 Objetivos

Em vista disso, os objetivos dessa tese foram:

- Caracterizar uma nova forma de doença do neurônio motor;
- Mapear um novo loco para a ELA8;
- Identificar um novo gene para a ELA8;
- Triagem de mutação em novas famílias com suspeita de doença do neurônio motor;
- Estudar a função e caracterizar a proteína VAP-B;
- Inativar a proteína VAP-B por meio de RNA de interferência;

## Capítulo 2

---

### **Pacientes e Métodos**

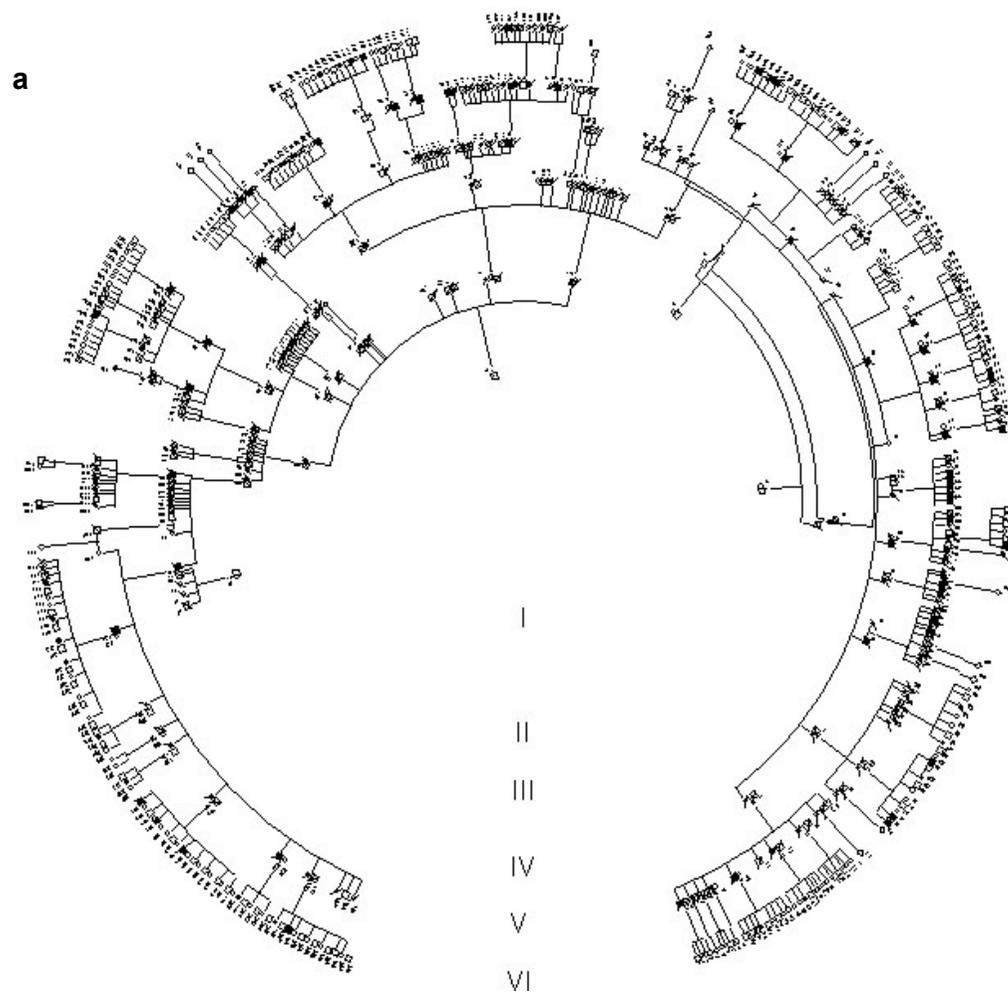
## 1. Pacientes e controles

Os pacientes foram avaliados clinicamente por neurologistas e encaminhados ao Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH), no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP). Os diagnósticos foram variáveis como distrofia muscular, amiotrofia espinhal do tipo adulto, esclerose lateral amiotrófica ou simplesmente doença do neurônio motor.

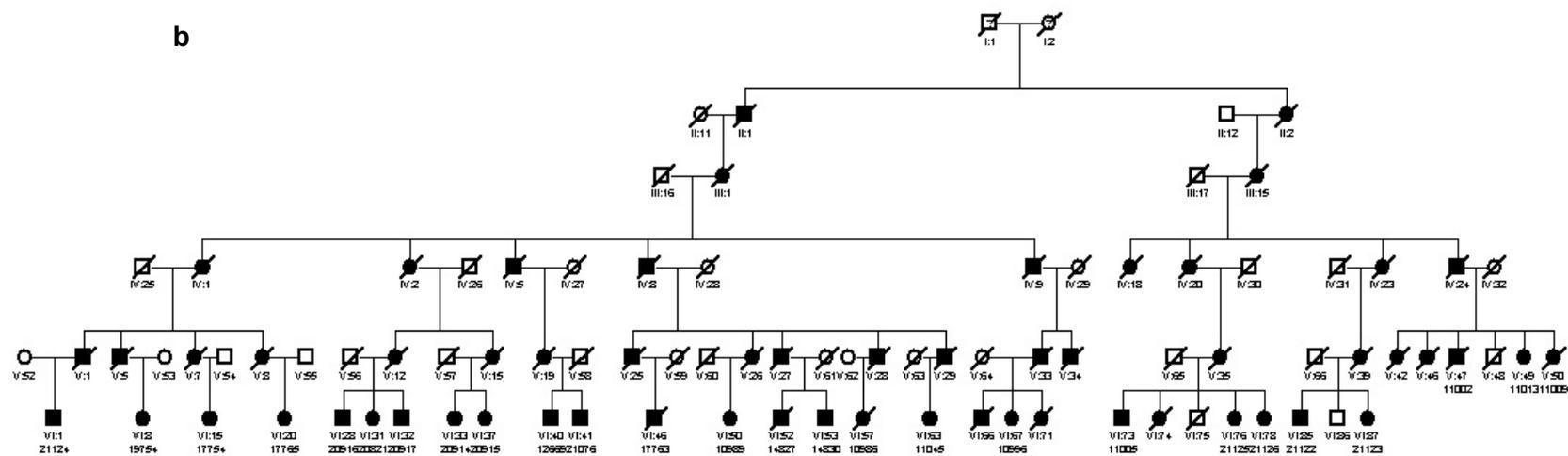
A primeira família (aqui denominada família 1 – Figura 4a e b) foi inicialmente estudada no final da década de 70 pelo Dr. Antonio Richieri-Costa. Suspeitou-se na época de amiotrofia espinhal do tipo Finkel. Uma segunda família (família 2, Figura 4c) apresentou sintomas semelhantes e verificou-se que ambas residem na cidade de Guarani (Minas Gerais) e arredores (Figura 5). Na época contabilizou-se 80 indivíduos portadores da doença.

Coletou-se uma amostra de sangue e realizou-se avaliação clínica e neurológica em aproximadamente 50 pacientes dessas famílias ao longo das décadas de 80 e 90 e mais recentemente em 2003 e 2005. As avaliações clínicas e neurológicas foram realizadas pelo Dr. Antônio Richieri-Costa e pelo Dr. Fernando Kok.

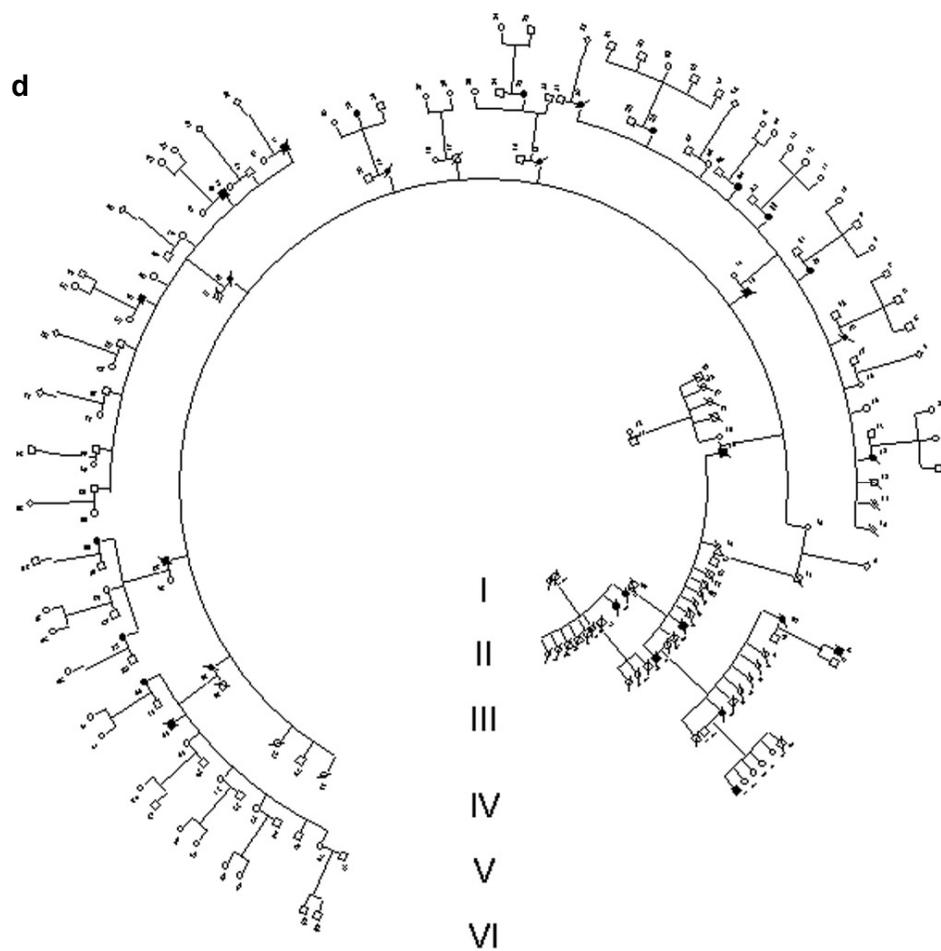
Três irmandades inicialmente não relacionadas foram encaminhadas para o nosso centro pela Dra. Helga C. A. Silva e Dr. Luiz Felipe Rocha Vasconcelos, com uma suspeita de doença do neurônio motor (uma forma atípica de esclerose lateral amiotrófica e/ou amiotrofia espinhal) entre 2001 e 2002. Mutações no gene da SOD1 (superóxido dismutase 1) e SMN1 foram previamente excluídas e após entrevista e o levantamento da genealogia, verificou-se que as três irmandades fazem parte da mesma família (família 3) Figura 4d e 4e.

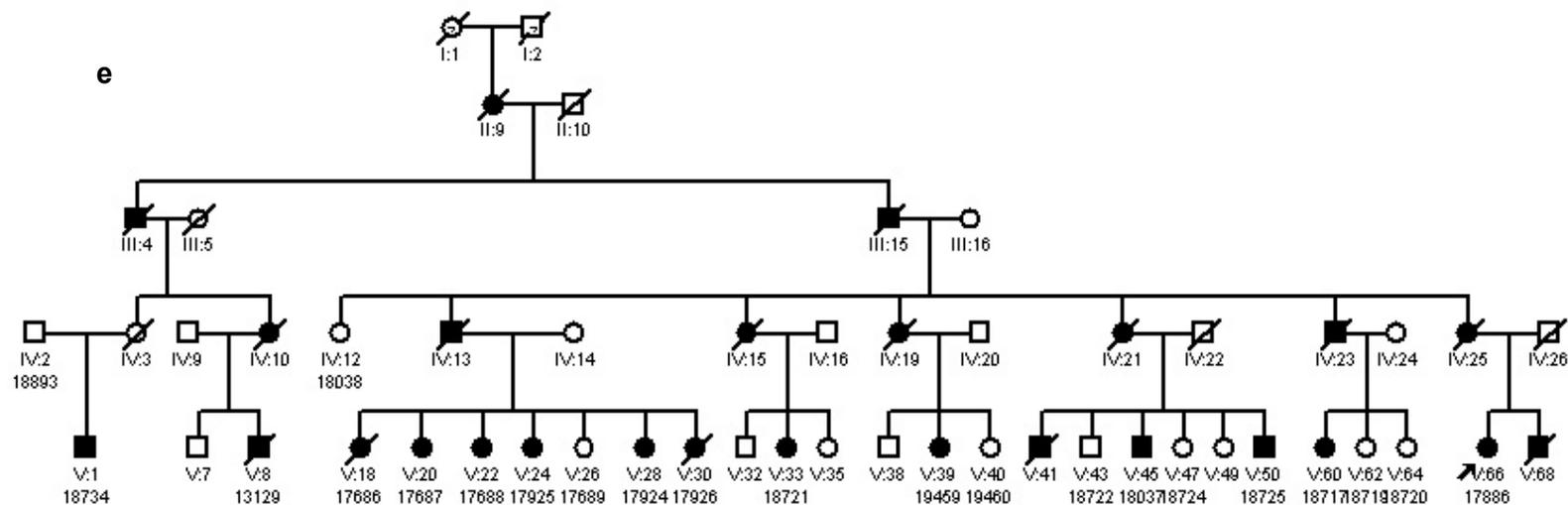


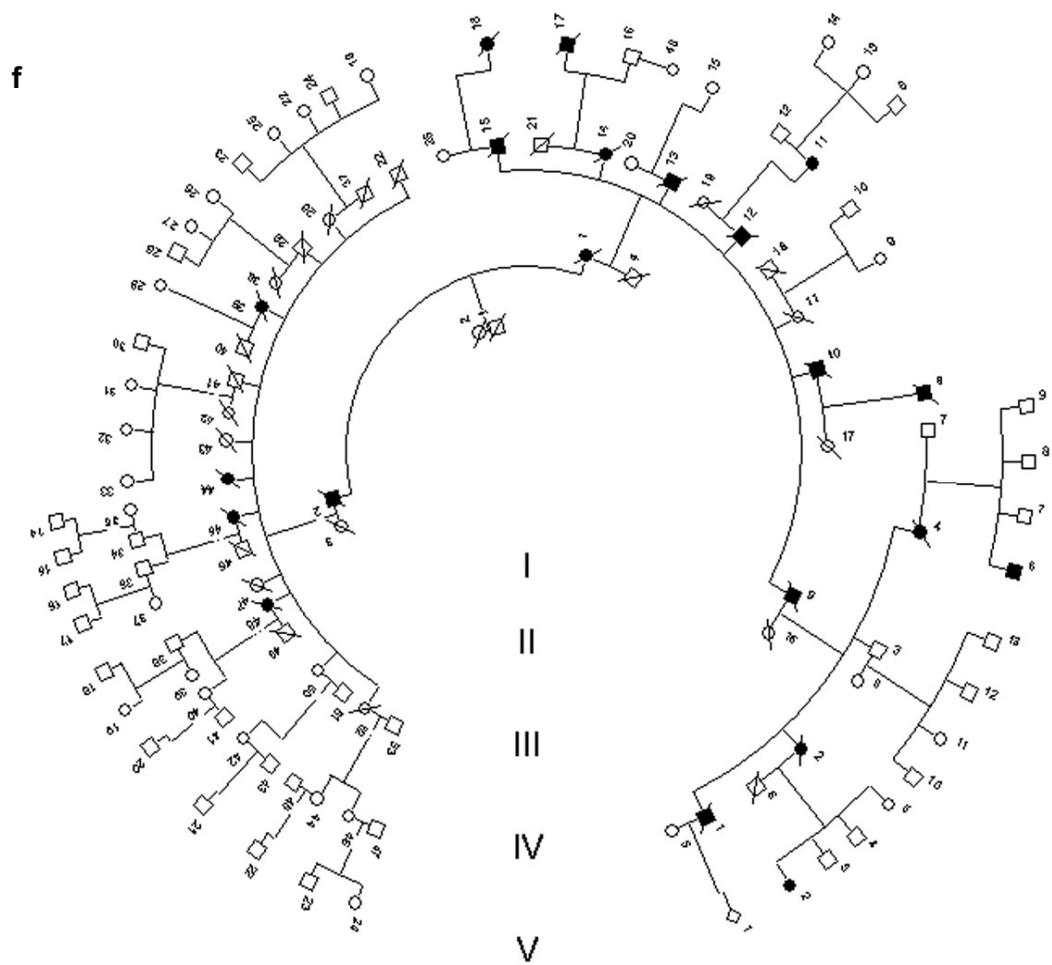
b



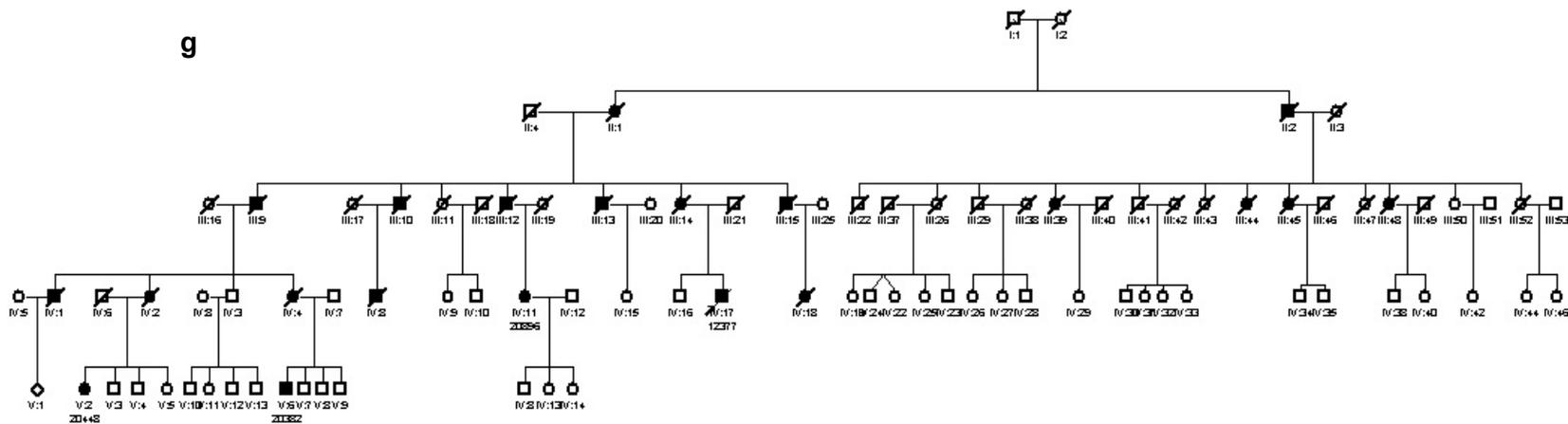




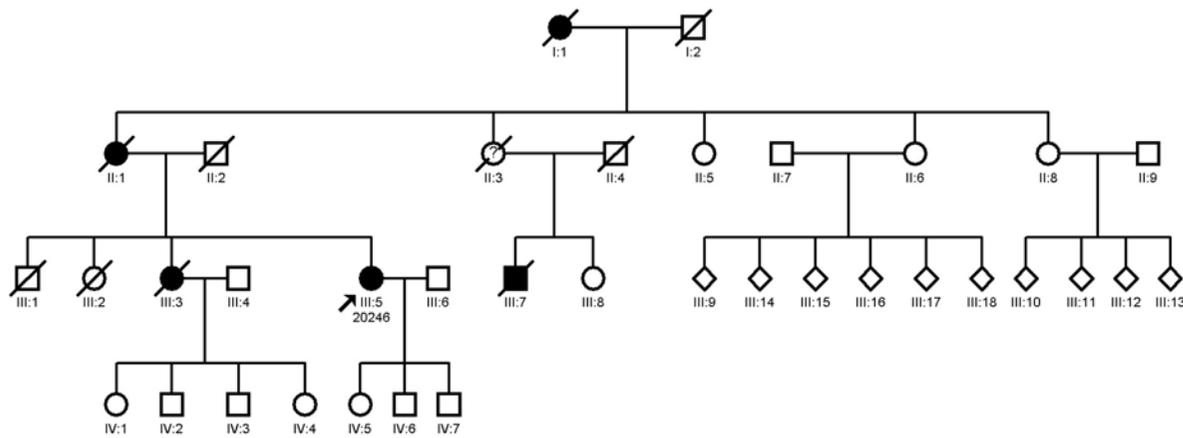


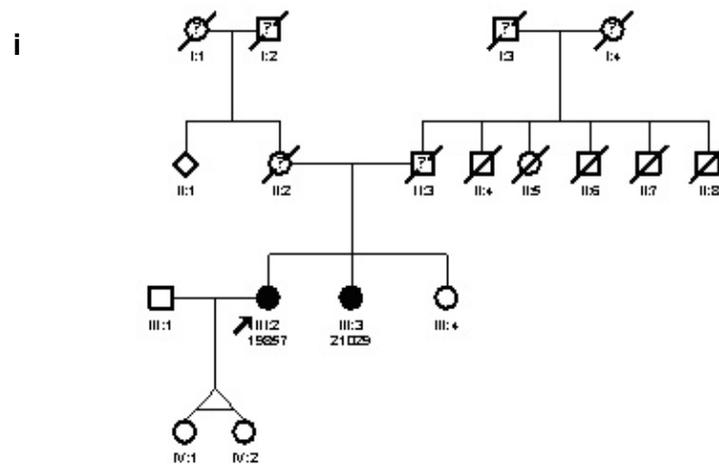


g



h





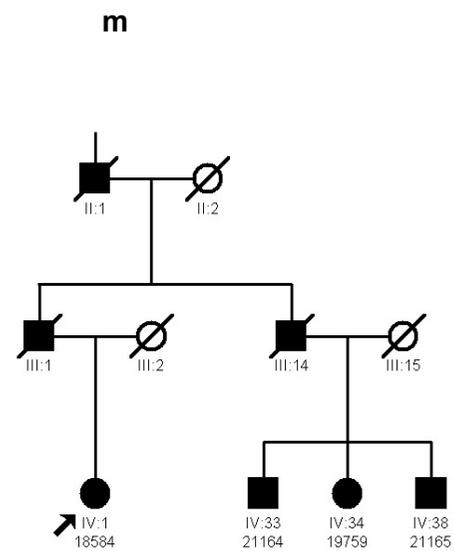
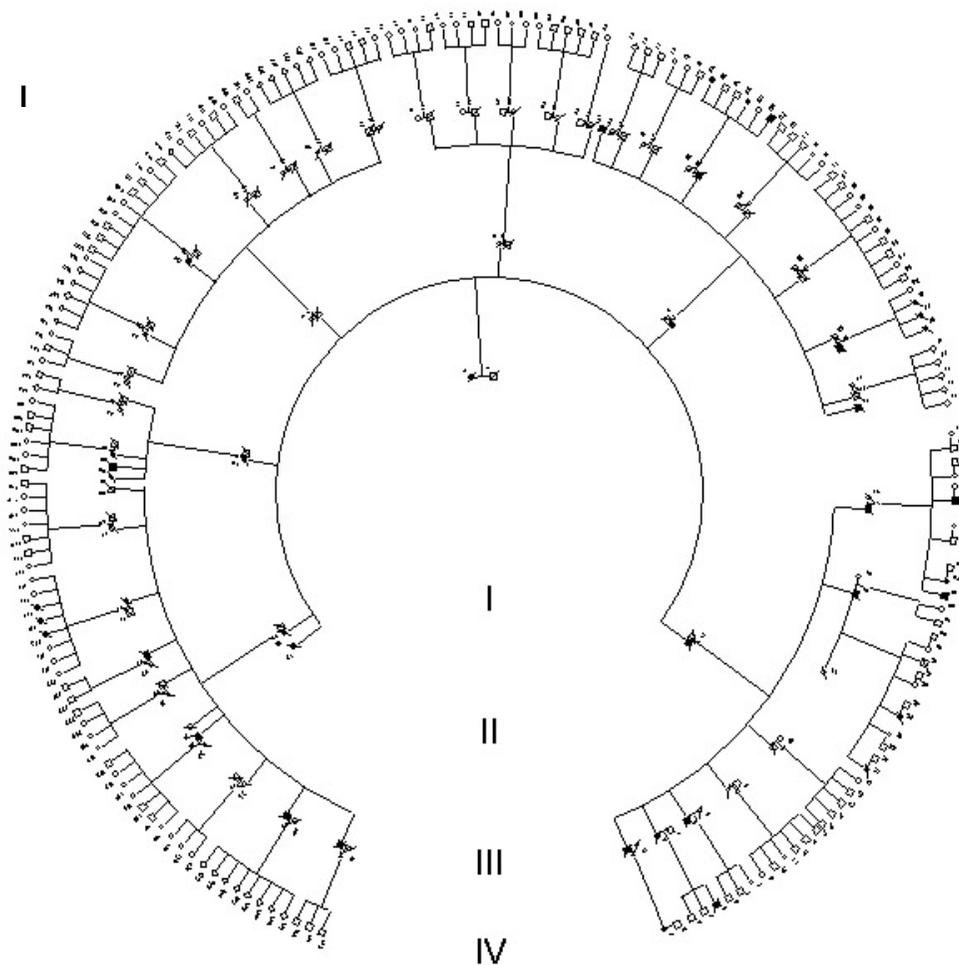


Figura. 4: Heredogramas das famílias com mutação no gene *VAP-B*. Família 1 (**a** – completa, **b** – resumida); família 2 (**c**); família 3 (**d** – completa, **e** – resumida) esta irmandade foi a estudada para mapear o loco *ELA8*; família 4 (**f** – completa, **g** – resumida); família 5 (**h**), família 6 (**i**), família 7 (**j**) e família 8 (**l** – completa, **m** – resumida).

Os membros dessa família residem em cidades de Minas Gerais (Mutum, Ouro Preto e Belo Horizonte), Rio de Janeiro, Espírito Santo e São Paulo (Figura 5).

Estes pacientes foram atendidos no CEGH e outros em visita domiciliar, nos quais foram avaliados clinicamente pela Dra. Helga Silva.

Um resumo da avaliação clínica e neurológica dos pacientes com *ELA8* incluídos nesse trabalho pode ser visualizado na tabela 14 do capítulo 13.



Figura. 5: Distribuição dos pacientes portadores de *ELA8* no Brasil.

Foram coletados DNA de 25 indivíduos da família 3 (11 pacientes e 14 indivíduos clinicamente normais). Como essa doença tem início tardio, optou-se por incluir os indivíduos clinicamente normais com idade superior a 65 anos. (ver capítulo 3).

A análise clínica e neurológica desta família mostrou se tratar de uma forma de Esclerose Lateral amiotrófica/Doença do Neurônio motor (ELA/DNM), de acordo com os critérios estabelecidos pelo *El Escorial* (Brooks *et al.*, 2000).

Após o processamento do material biológico, foram excluídos os locos já conhecidos para a ELA (Tabela 2) e iniciou-se o mapeamento de um novo gene.

Outras cinco famílias (famílias 4, 5, 6, 7 e 8 – Figuras 4f – m) com diagnóstico semelhante foram encaminhadas ao CEGH para avaliação.

Esta nova forma de doença do neurônio motor foi denominada ELA tipo 8 (*amyotrophic lateral sclerosis type 8 - ALS8*) pelo *Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)* – MIM,608627.

Os pacientes com Doença de Alzheimer foram encaminhados ao CEGH após avaliação clínica, neurológica e psiquiátrica pelo Dr. Ricardo Nitrini, Dra. Valéria Santoro Bahia, Dr. Paulo Roberto de Brito-Marques e Dr. Paulo Bertolucci.

O grupo controle foi selecionado de acordo com a idade, sexo e grupo étnico. O DNA desses indivíduos pertence ao banco de DNAs do CEGH. Além disso, o grupo controle para os estudos em Doença de Alzheimer foi selecionado após entrevista e aplicação dos testes *Mini-Mental State Exam (MMSE)* e *Clinical Dementia Rating (CDR)* realizados pela autora, pelos estudantes do CEGH e estudantes e funcionários da Universidade de São Paulo, Universidade Federal de São Paulo, Universidade Federal de Pernambuco e Faculdade de Medicina de Recife. Uma parte dos indivíduos controles incluídos nesta tese pertence ao grupo de idosos que freqüentam o Centro de Práticas Esportivas (CEPE), USP.

Todos os indivíduos mencionados no presente trabalho foram informados e consentiram em participar da pesquisa.

## **2. Métodos**

### **2.1. Extração de DNA de sangue periférico**

O DNA foi extraído segundo metodologia descrita por Miller *et al.*, 1988 e adaptada para a utilização em nosso laboratório.

Inicialmente 10 ml de sangue periférico de cada indivíduo foram coletados em tubo contendo EDTA 5% (200µl para cada 5 ml de sangue) e homogeneizados. O protocolo está descrito a seguir:

- Transferir o sangue para um tubo de propileno completando para 50ml com solução de lise (1550mM NH<sub>4</sub>Cl; 100mM KHCO<sub>3</sub>; 10mM EDTA pH=7,4) e homogeneizar, invertendo o tubo várias vezes;
- Manter o tubo no gelo por 30 minutos para a lise da membrana celular;
- Centrifugar por 15 minutos a 1.800 rotações por minuto (rpm);
- Desprezar o sobrenadante e lavar o precipitado em 10ml de solução de lise;
- Centrifugar por 5 minutos a 1,800 rpm;
- Desprezar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 3 ml de solução de lise de membrana nuclear (100mM Tris-HCl pH=8,0; 4M NaCl; 20mM EDTA pH=8,2);
- Adicionar 50µl de pronase E ou 70µl de proteinase K na concentração de 10mg/ml e 300µl de SDS 10%;
- Homogeneizar levemente e incubar a temperatura de 37°C por um período de 12 - 24 horas;
- Após a incubação, adicionar 1ml de 6M NaCl e misturar vigorosamente;
- Centrifugar por 20 minutos a 2.500 rpm;
- Transferir o sobrenadante para um tubo limpo e centrifugar novamente por 15 minutos a 2.500 rpm;
- Transferir o sobrenadante para um tubo de vidro. Precipitar o DNA adicionando-se duas vezes o volume de etanol absoluto e invertendo algumas vezes cuidadosamente;
- Coletar o DNA com um auxílio de um capilar de vidro com a extremidade soldada;
- Lavar o DNA em etanol 70%;
- Colocar o DNA em um tubo de microcentrífuga devidamente identificado;
- Dissolver o DNA no tubo acrescentando-se 400µl de solução de TE<sup>-4</sup> (10mM Tris-HCl pH=8,0; 100µM EDTA pH=7,4) e desprezar o capilar de vidro;
- Incubar a 65°C por 30 minutos e
- Armazenar as amostras a 4°C.

## 2.2. Análise de DNA

### 2.2.1. Amplificação do DNA por meio da técnica de Reação de Cadeia da Polimerase

O fragmento de DNA foi amplificado pro meio da reação da cadeia da polimerase (do inglês PCR- *Polymerase Chain Reaction*) desenvolvida e modificada por Saiki *et al.*, 1985.

Foram utilizadas no presente trabalho diferentes condições de PCR (para análise de microssatélite utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) fluorescentes ou dNTP com marcação do isótopo P<sub>32</sub>. A seguir, será descrito somente o protocolo padrão:

Adicionar os seguintes reagentes em um tubo de microcentrifuga para o volume final de 10µl<sup>1</sup>:

Reagentes	Volume	Concentração final
10X PCR Buffer	1µl	1X
25mM dNTP mix	1µl	0,25mM de dATP, dgTP, dTTP e dCTP
50mM MgCl <sub>2</sub>	0,3µl	1,5mM
Primer mix (20µM)	0,5µl	10µM de cada
DNA	1µl	100ng
Água destilada	5,6µl	-
Taq DNA Polymerase (5U/µl) ( <i>Invitrogen Life technologies</i> ) n° cat. 11615-010	0,1µl	0,5U

As condições da PCR foram:

- Incubar os tubos no termociclador a 94°C por 5 minutos até a completa desnaturação do DNA,
- Realizar 25-35 ciclos de amplificação de PCR a seguir:
  - **Desnaturação** 94°C por 30 segundos
  - **Hibridação (*annealing*)** 55° - 63°C por 30 segundos
  - **Extensão** 72°C por 40 segundos

<sup>1</sup> Em algumas reações foram adicionadas 5 ou 10% de DMSO para melhor amplificação do fragmento de DNA.

- Incubar a temperatura de 72°C por 6-10 minutos (extensão final) e manter a reação a 10°C. As amostras podem ser estocadas a 4°C até o uso.
- Analisar o produto da amplificação por meio de eletroforese em um gel de agarose 1,5% à 130V por 40 minutos. Aproximadamente 3µl de produto de PCR foram adicionados a 2µl de tampão de corrida (BFB – sucrose 40%; bromofenol blue 0,25%) e aplicados no gel juntamente com um marcador de peso molecular conhecido.
- Visualizar o produto de PCR com coloração de brometo de etídio (0,5µg/ml) em um transluminador de luz ultravioleta (não se realiza essa última etapa para análise de microssatélites).

### I. Análise de microssatélites

A análise de microssatélites foi utilizada para o mapeamento do loco ELA8. Inicialmente utilizaram-se marcadores fluorescentes do kit *ABI Prism™ Linkage Mapping Set Version 2 (Applied Biosystems)* e após a identificação do novo loco para ELA8, optou-se utilizar PCR radioativo (com a introdução do isótopo P<sub>32</sub>) para diminuir a região de ligação.

#### I.1. PCR fluorescente

Foram utilizados marcadores do kit, que consiste de 28 painéis de oligonucleotídeos iniciadores marcados com três fluoróforos diferentes (**NED**, **HEX** e **FAM**), no qual cada marcador está disperso em aproximadamente 10cM. Cada painel contém de 10 a 20 oligonucleotídeos iniciadores e contém no total 400 oligonucleotídeos iniciadores.

Após a amplificação do fragmento alvo, o produto de PCR é diluído em água, de acordo com o fluoróforo utilizado.

- Produto de PCR marcado com FAM ou HEX – diluição 1:20
- Produto de PCR marcado com NED – diluição 1:10

A seguir, adiciona-se em um tubo de microcentrífuga:

0,3µl de Size Standard (MegaBACE ET550-R Size Standard 25-6550-02);

2,7µl Tween 20 (0,1%);

2µl de produto de PCR diluído

O produto final analisado no Seqüenciador *Amersham Mega Bace 1000 DNA Sequencers* e analisado com o auxílio do programa *Mega Bace genetic Profiler version 1.5*, conforme instruções do fabricante.

### **I.2. PCR com isótopo radioativo ( $P_{32}$ )**

A PCR foi realizada de acordo com os procedimentos padrões, exceto a adição de 0,075µl de dCTP marcado com o isótopo  $P_{32}$ . O mix de dNTP é composto de 0,2mM de dATP, dgTP, dTTP e 2,5µM de dCTP

Doze marcadores adicionais foram utilizados para diminuir a região de ligação no cromossomo 20 (Tabela 3).

O produto de PCR foi misturado com 8µl de corante SSCP – *loading buffer* (95% formamida, 0,02M EDTA, 0,5% xilenocianol e 0,5% bromofenol blue) e posteriormente desnaturado a 94°C por 5 minutos e submetido à eletroforese em gel desnaturante de poli(acrilamida) 6,5% (1 bis-acrilamida:19 acrilamida), 40% uréia e TBE 1X (Tris 89mM, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM) e submetido a corrida a 2000V, 60mA e 90W por 1 hora e 30 minutos em tampão TBE 1X. Em seguida o gel foi drenado a 80°C com auxílio de uma bomba a vácuo por 30 minutos e exposto a filme de raio-X (*X-OMAT, Kodak*) em um chassis contendo intensificadores por um período de 2 – 24 horas, dependendo da intensidade da radiação emitida (monitorada com um contador *Geiger*).

## **II. Triagem de mutações no gene *VAP-B***

As condições utilizadas para a triagem de mutações assim como a seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores para o gene *VAP-B* podem ser observadas no Tabela 4.

### **2.3. Análise de *LOD Score***

A análise dos genótipos obtidos para cada análise foi realizada com o auxílio do programa de computador *MLINK* do pacote *FASTLINK* (Lathrop *et al.*, 1984. Terwilliger *et al.*, 1994).

Os resultados foram calculados para várias frações de recombinação ( $\theta$ ) diferentes, desde  $\theta = 0$  (equivalente a 0 cM, isto é, nenhuma recombinação entre o marcador e o loco da doença) até  $\theta = 5$  (equivalente a 50 cM, isto é, segregação ao acaso), seguindo a fórmula:

$$Z = \log_{10} \frac{\text{Probabilidade dos locos estarem ligados em } \theta}{\text{Probabilidade dos locos terem segregação independente}}$$

Os valores de  $Z$  são denominados *lod scores* (do inglês *logarithm of the odd*, de onde vem a sigla *lod*) ou em português, “logaritmo das chances”. Em um conjunto de famílias, a probabilidade total de ligação é o produto das probabilidades de cada família individualmente. Assim, como são logaritmos, os valores de *lod score* das diferentes famílias podem ser somados.

Os valores positivos para  $Z$  sugerem que é mais provável a ligação entre dois locos próximos, enquanto que valores negativos indicam que a probabilidade dos dois locos não estarem ligados é maior. Por se tratar de uma função logarítmica, o valor de *lod score* maior ou igual a 3 equivale a uma chance de 1000:1 a favor da ligação ( $\log_{10}(1000) = 3$ ). A ligação pode ser rejeitada se  $Z < -2,0$ . Valores de  $Z$  entre  $-2$  e  $+3$  são não-conclusivos. Para a estimativa da distância genética entre dois locos ligados, considera-se o valor de  $\theta$  no qual o  $Z$  é maior ( $Z_{\max}$ ). Essa análise é possível somente para dois locos, sendo denominado, portanto, “mapeamento de dois pontos” (*lod score two-point*).

A análise de ligação com os dados de mais de dois locos simultaneamente é denominado “análise multipontos” (*lod score multipoint analysis*). Essa análise é uma extensão do *lod score* dois pontos e é especialmente útil para estabelecer a ordem cromossômica em um conjunto de locos ligados.

Quando a análise de dois pontos é utilizada, não é possível saber exatamente se onde loco da doença está localizado em relação ao marcador, entretanto com a análise de multipontos é possível estabelecer a sua provável localização entre os marcadores.

A “análise multipontos” foi possível com o auxílio do programa de computador *GENEHUNTER* (Sobel *et al.*, 1996) Por fim, é possível montar uma curva de probabilidades (Z) versus localização no mapa (cM).

A ordem dos marcadores foi baseada em três diferentes mapas genéticos disponíveis *online*. Foram consultados os mapas genéticos do *Marshfield* (*The Center for Medical Genetics, Marshfield Medical Research Foundation database*), *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* e *Ensembl database*. Todas as informações dos marcadores de microssatélites foram obtidas do UNISTS do *NCBI* e *Genome Databank*.

Como as freqüências alélicas variam de acordo com a população estudada, foram analisados pelo menos 30 cromossomos de controles normais brasileiros. Para as análises de *lod score* dois pontos e multipontos, foram considerados os parâmetros de herança autossômica dominante com penetrância 1 e taxas de recombinação iguais entre homens e mulheres e a freqüência do gene de 0,0001.

Inicialmente foi realizada a análise de dois pontos e em seguida, realizamos a análise de multipontos.

## **2.4. Seqüenciamento**

### **2.4.1. Purificação**

O produto de PCR contém muitas impurezas e para se obter uma seqüência de boa resolução é necessária à realização da “purificação”.

Duas enzimas foram utilizadas na purificação do produto de PCR: a éxonuclease, que degrada resíduos de DNA fita única e a SAP (*Shrimp alkaline phosphatase*), que hidroliza dNTP do mix do PCR.

10 µl produto de PCR

0,5 µl de éxonuclease

1 µl de SAP

Deixar a 37°C por 1 hora e aquecer a 80°C por 20 minutos. Armazenar a 4°C ou realizar a reação de seqüência imediatamente.

#### 2.4.2. Reação de seqüência

Adicionar em um tubo de microcentrifuga:

2µl de PCR (depende da concentração)

5µl de *Pré-Mix* (Amersham Biosciences, UK)

1µl de primer (5 µM)

Completar para 10 µl de H<sub>2</sub>O Mili-Q

Aquecer a 95°C por 20 segundos e resfriar a 60°C por 1 minuto e 15 segundos. Repetir o ciclo 25 vezes. Armazenar a 4°C até a precipitação.

O produto de PCR deve estar em uma concentração aproximada de 20-50ng/µl. Separar o produto purificado em dois tubos para cada reação, um para a fita 5'>3' (*forward*) e outra no sentido contrário 3'>5'(*reverse*). O *pré-mix* contém tampão e nucleotídeos dideoxi (ddNTP). Os nucleotídeos ddNTP são quimicamente modificados contendo marcadores fluorescentes diferentes e é usado combinado a outros dNTPs.

A temperatura de extensão é diminuída de 72°C a 60°C para permitir a incorporação do ddNTP marcado. Quando um ddNTP é incorporado, reação de extensão se finaliza. Após 30-40 ciclos, haverá dentro do tubo inúmeras cadeias de diferentes tamanhos contendo diferentes marcadores fluorescentes na sua porção final. Eles apresentarão um padrão de migração diferencial em gel de eletroforese de acordo com o seu tamanho. O fluoróforo será detectado com a utilização de um seqüenciador automático, pois as moléculas de fluoróforo excitadas emitirão uma luz de distintas cores dependendo do marcador associado a cada nucleotídeo. Este sinal é captado em um espectógrafo que separará as luzes de acordo com o seu comprimento de onda e será armazenado no aparelho.

#### 2.5. Cultura de células CHO

As células CHO (*Chinese Hamster Ovary*) foram cultivadas em monocamada em frascos de 175 cm<sup>3</sup> (Corning Inc. cat N. 431080) contendo meio de cultura.

Meio de Cultura:

500ml de meio Ham F-12 (HAM) com glutamina [Invitrogen – cat. N. 21765-029]

50ml de soro fetal bovino [Autogen Bioclear – cat. N. S0115]

5ml 100X Penicilina/estreptomicina [Invitrogen – cat N. 15070-063]

As células foram mantidas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> 5%. Após atingir confluência de 80-90% as células foram transferidas para outro frasco (passagem). As células CHO podem ser repicadas até a passagem 40.

### **2.5.1. Passagem**

Após remover o meio de cultura, lavar brevemente as células com 3ml contendo uma solução de tripsina (0,05%) – EDTA (0,53mM) (Invitrogen – cat N. 25300-062). Adicionar novamente 3ml de tripsina – EDTA e deixar na estufa a 37°C por 1-2 minutos. A tripsina auxilia na liberação das células CHO e se torna ativa somente a 37°C. Retirar os frascos da estufa e bater vigorosamente auxiliando na liberação das células. Adicionar 7ml de meio de cultura para inativar à ação da tripsina e homogeneizar gentilmente com o auxílio de uma pipeta para evitar a formação de agregados celulares. Avaliar a densidade celular com o auxílio de um hemocítômetro, se necessário.

Em um novo frasco de 175 cm<sup>3</sup>, anotar o número da passagem e os dados pertinentes ao experimento. Adicionar 20ml de meio de cultura e de 1,5 a 2ml de meio contendo as células CHO ou aproximadamente 1,5 X 10<sup>5</sup> células. Acondicionar na estufa a 37°C por três dias (80-90% confluência) até a próxima passagem ou congelar em nitrogênio líquido. Para o congelamento, as células devem estar em meio de cultura contendo 10% DMSO. Deixar inicialmente a -20°C por 10 minutos, posteriormente deixar a -80°C até o dia seguinte e transferir para o nitrogênio líquido.

## **2.6. RNA de interferência (RNAi)**

### **2.6.1. Oligonucleotídeos**

Os oligonucleotídeos foram baseados em programas da companhia Ambion e Promega. Os oligonucleotídeos contêm em sua extremidade 5'sítio de ligação para a enzima Bgl II e na porção 3' sítio de ligação para Hind III (Figura 6).

A sua localização no cDNA da VAP-B pode ser observado na figura 7.

Os oligonucleotídeos foram diluídos a 3mg/ml.

### 2.6.2. Reação de anelamento (*annealing*)

Aproximadamente 1µl de cada primer (*forward* + *reverse*) e 48 µl de *annealing buffer* (100mM NaCl and 50mM HEPES pH 7,4)

Incubar o mix a 90°C durante 5 minutos, manter a 70°C por 10 minutos e resfriar lentamente até 37°C por 20 minutos e deixar a temperatura ambiente até o uso.

Linearizar o vetor pSuper.gfp/neo (Oligoengine) utilizando as enzimas de restrição Bgl II e Hind III a 37°C por duas horas.

Realizar a ligação entre os oligos e o vetor pSuper adicionando T4 DNA ligase. Transformar o vetor em bactéria (Max competent DH5- $\alpha$  cells, Invitrogen UK Cat. N. 18258-012) e identificar a colônia correta. Somente as colônias com o inserto (oligonucleotídeos anelados) devem ser utilizadas na transfecção.

Confirmar o inserto seqüenciando o plasmídeo. Utilizar o M13 reverse primer (AACAGCTATGACCATG).

Informações adicionais podem ser visualizadas em [www.oligoengine.com](http://www.oligoengine.com).

### 2.6.3. Transfecção

Um dia antes da transfecção, plaquear aproximadamente 2-10 X10<sup>5</sup> células CHO em uma placa de 100 mm e adicionar aproximadamente 10 ml de meio de cultura (*F12-Ham*). Incubar a 37°C em uma estufa de CO<sub>2</sub> até as células atingirem 50-80% de confluência.

No dia da transfecção retirar o meio de cultura e adicionar um meio sem soro (neste caso foi utilizado *Opti-Mem* (Invitrogen cat N. 31985-047))

Misturar em um tubo de polipropileno 8-10µg de DNA e 800µl *Opti-Mem*

Em outro tubo misturar 30µl de lipofectamina (é um lipossomo que auxilia na transfecção – Invitrogen cat N.18324-020) e 800µl *Opti-Mem*

Juntar as duas soluções e deixar a temperatura ambiente por 15-45 minutos para que ocorra a formação do complexo DNA-lipossomo

Acrescentar 6,4ml de *Opti-Mem* e gentilmente adicionar a solução nas células CHO. Incubar as células a 37°C em uma estufa de CO<sub>2</sub> por no mínimo 5 horas.

Adicionar 8ml de meio de Cultura F12 (Ham) sem remover a solução de transfecção.

No dia seguinte substituir o meio de cultura. A transfecção é transiente e utilizar 24-72 horas após transfecção.

VAP-B-RNAi1 (éxon 3 VAP-B)

5' - **GATCCCC** **GTTACAGCCTTT** **CGATTATTTCAAGAGAATAATCGAAAGGCTGTAAC** **TTTTTA** -3'  
 3' - **GGGCAATGTCGGAAAGCTAATAAAGTTCTCTTATTAGCTTTCCGACATTGAAAAATTCGA** -5'  
 (BglII)      Seq. VAP-B senso      **Hairpin**      Seq. VAP-B anti-senso      (Hind III)

VAP-B-RNAi2 (éxon 4 VAP-B)

5' - **GATCCCC** **GAAGACCTTATGGATTCAA** **TTCAAGAGATTGAATCCATAAGGTCTTC** **TTTTTA** -3'  
 3' - **GGGCTTCTGGAATACCTAAGTTAAGTTCTCTAACTTAGGTATTCCAGAAGAAAAATTCGA** -5'

VAP-B-RNAi3 (éxon 3 VAP-B)

5' - **GATCCCC** **GATGTTACAGCCTTT** **CGATTTCAAGAGAAATCGAAAGGCTGTAACATC** **TTTTTA** -3'  
 3' - **GGGCTACAATGTCGGAAAGCTAAAGTTCTCTTAGCTTTCCGACATTGTAGAAAAATTCGA** -5'

Figura. 6: Seqüência de três pares de oligonucleotídeos utilizados para os experimentos de RNA de interferência (em vermelho – sítio de restrição para as enzimas Bgl II e Hind III, em azul – seqüência senso e anti-senso da VAP-B e em preto seqüência *hairpin*).

ATGGCGAAGGTGGAGCAGGTCCTGAGCCTCGAGCCGCAGCACGAGCTCAAATTCC  
 GAGGTCCCTTCACCGATGTTGTCACCACCAACCTAAAGCTTGGCAACCCGACAGA  
 CCGAAATGTGTGTTTTAAGGTGAAGACTACAGCACCGTAGGTACTGTGTGAGG  
 CCCAACAGCGGAATCATCGATGCAGGGCCTCAATTAATGTATCTGTGATGTTAC  
 AGCCTTTCGATTATGATCCCAATGAGAAAAGTAAACACAAGTTTATGGTTCAGTC  
 TATGTTTGCTCCAACCTGACACTTCAGATATGGAAGCAGTATGGAAGGAGGCCAAAA  
 CCGGAAGACCTTATGGATTCAAACTTAGATGTGTGTTTGAATTGCCAGCAGAGA  
 ATGATAAACCCACATGATGTAGAAATAAAATAAATTATATCCACAACCTGCATCAAA  
 GACAGAAACACCAATAGTGTCTAAGTCTCTGAGTTCTTCTTTGGATGACACCGAA  
 GTTAAGAAGGTTATGGAAGAATGTAAGAGGCTGCAAGGTGAAGTTCAGAGGCTAC  
 GGGAGGAGAACAAGCAGTTC AAGGAAGAAGATGGACTGCGGATGAGGAAGACAGT  
 GCAGAGCAACAGCCCCATTT CAGCATTAGCCCCAACTGGGAAGGAAGAAGGCCTT  
 AGCACCCGGCTCTTGCTCTGGTGGTTTTGTTCTTTATCGTTGGTGTAAATTATTG  
 GGAAGATTGCCTTGTA

Figura. 7: Seqüência de cDNA da VAP-B. Os éxons podem ser visualizados em preto e azul. Os oligonucleotídeos estão diferenciados (sublinhado ou em vermelho) e estão localizados nos éxons 3 e 4.

#### 2.6.4. Lisado celular

Extrair proteínas celulares por meio de solução de lise.

Após a transfecção (24-72hs), lavar a monocamada com PBS e adicionar a solução de lise. Raspar as células e recolher a solução contendo as mesmas em um tubo de 1.5 ml. Deixar no gelo por 20 minutos.

Centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C.

Transferir o sobrenadante em um novo tubo.

Ler a concentração de proteína e aliquotar.

#### 2.6.5. Western blot

Para cada amostra, foram utilizados 10µg de proteínas.

Adicionou-se 1X loading buffer (4X loading buffer: 50mM Tris-HCl pH 6,8; 10% SDS; 2% glicerol e 0,5% de bromofenol blue). Adicionar DTT 1:5 somente quando for realizar a eletroforese. Aquecer as amostras a 95C por 10 minutos.

Preparar o gel de poliacrilamida 10% (0,75mm):

Acrilamida 30%	1,67ml
1,5M Tris-HCl (pH8,8)	1,25ml
10% SDS	0,05ml
10% APS	25 $\mu$ l
TEMED	2 $\mu$ l
Água	2,05ml

Esperar polimerizar durante 30 minutos e preparar o gel de acrilamida 4%.

#### **Stacking gel**

Acrilamida 30%	0,13ml
0,5M Tris-HCl (pH6,8)	0,25ml
10% SDS	10 $\mu$ l
10% APS	5 $\mu$ l
TEMED	1 $\mu$ l
Água	0,61ml

Deixar polimerizar por 30 minutos a temperatura ambiente e aplicar as amostras.

#### **Eletroforese de proteínas**

Ferver os extratos por 10 minutos, centrifugar e aplicar no gel de poliacrilamida 10%, com *stacking gel* de 4% e correr com 500 mL de tampão de corrida 120 V.

#### **I. Transferência para membrana de nitrocelulose**

- Após a corrida, separar uma cuba e adicionar o tampão de corrida (20% metanol). Adicionar a membrana de nitrocelulose (Hybond, Amersham Bioscience, Cat. N. RPN303P) no tampão.
- Separar papel de filtro e mergulhar no tampão de transferência.
- Colocar na seguinte ordem: papel de filtro, gel de acrilamida, membrana de nitrocelulose e papel de filtro previamente mergulhado em tampão de transferência. Evitar formação de bolhas de ar.

- Eletroforese por aproximadamente 2 horas a 65mA
- Lavar a membrana com TBS (2 vezes por 5 minutos). A membrana deve ser corada imediatamente ou secar e estocar a 4°C para posterior revelação
- Lavar a membrana em TBS contendo 0,3% Tween 20 a temperatura ambiente por 30 minutos.
- Lavar em TBS contendo 0,3% Tween 20 (3 vezes por 5 minutos)
- Lavar com água destilada para remover o excesso de sal.
- Incubar a membrana com PROTOGOLD (BBInternational) e manter em contínua agitação. As proteínas irão aparecer em rosa em poucos minutos. Deixar no máximo 30 minutos no agitador.
- Lavar a membrana (5 vezes por 2 minutos) com água destilada para remover o excesso de PROTOGOLD.
- Bloquear a membrana com uma solução de TBS contendo 10% leite e 0,1% Tween 20
- Incubar com o anticorpo primário diluído em solução de TBS contendo 3% de leite e 0,1% Tween 20 overnight a 20C em contínua agitação
- No dia seguinte, lavar a membrana com TBS contendo 3% de leite e 0,1% Tween 20 (3 vezes por 5 minutos)
- Incubar com o anticorpo secundário no mesmo tampão por aproximadamente 30 minutos
- Lavar a membrana com a mesma solução (3 vezes por 5 minutos)
- Lavar com TBS (3 vezes por 5 minutos)

## II. Revelação

O kit de quimioluminiscência (ChemiLucent – Chemicon International – Cat. N. 2600) foi utilizado neste experimento.

- Preparar 1:1000 diluição de solução de Peróxido com Peróxido Buffer e adicionar o mesmo volume de ChemiLucent luminol/enhancer. Manter em contínua agitação por 5 minutos
- Colocar a membrana em um saco plástico
- Expor a membrana em um filme de raio X dentro de um cassete.

### 2.7. Análise de haplótipos

Os haplótipos foram inferidos de acordo com a segregação dos alelos e confirmados com o uso do programa **GC** (*gene-counting*) Zhao *et al.*, 2002.

A origem da mutação foi estimada utilizando a probabilidade das chances com o programa **Estiage** (Genin *et al.*, 2004).

### 2.8. Soluções

#### 4% PFA (paraformaldeído)

##### REAGENTE TÓXICO

Preparar 500ml de buffer Fosfato

40mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1H<sub>2</sub>O

160mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Dissolver a 60°C

40g de paraformaldeído

1-3 gotas de 10M NaOH

500ml de água

Uma vez dissolvido, adicionar buffer fosfato e acertar o pH para 7-7,4

Aliquotar e estocar a -20°C

#### Buffer TBE (pH 8,3)

90mM Tris

88,95mM ácido ortobórico

3,35mM EDTA

#### Buffer TE

10mM Tris (pH 7,5)

1mM EDTA

#### LB líquido

25g LB

1L água

Autoclavar

**LB/agar ampicilina**

25g LB (ou 5g de triptona, 2,5g de levedura, 2,5g NaCl e 0,5g de glucose para 500ml de solução final)

1,5-2% Ágar

Ajustar o pH a 7 (NAOH 5N)

Autoclavar e resfriar a 50°C

Adicionar ampicilina (100µg/ml)

Colocar 25ml em placas de petri e armazenar a 4°C até o uso

**PBS (10X – 1L)**

1,4M NaCl

27mM KCl

25mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

23mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O

**PBST (10X – 1L)**

1,4M NaCl

27mM KCl

25mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

23mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O

0,5% Tween 20

***Stripping buffer para blots***

100mM Beta-mercaptoetanol

62,5mM Tris-HCl pH=6,7

2% SDS

50°C por 30 minutos

Lavar duas vezes por 10 minutos em TBST

**Solução de lise**

50mM Tris-HCl pH=7.6

150mM NaCl

1mM EDTA

1% Triton

1X Protein Inhibitor (Cocktail tablet – Roche 11 697498 001)

**Tampão de corrida (10X) – 1 L (*western blot*)**

250mM Tris

1,92M Glicina

1% SDS

1 L água

Recomenda-se estocar a 4°C.

**Solução de transferência (10X) – 1 L (*western blot*)**

250mM Tris

1,92M Glicina

0,2% SDS

1 L água

Adicionar 20% metanol somente quando for transferir as amostras para a membrana.

**TBS (10X – 1L) pH=7,6**

24,2 g Tris (50mM)

80g NaCl (50mM)

**TBST (10X – 1L) pH=7,6**

24,2 g Tris (50mM)

80g NaCl (50mM)

0,5% Tween 20

Tabela 3: Marcadores utilizados para restringir a região de ligação no cromossomo 20.

Marcador	Frequência	Tamanho do produto de PCR (pb)	Posição no mapa genético		Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores	
			Ensembl <sup>1</sup>	NCBI <sup>2</sup>	<i>forward</i>	<i>reverse</i>
D20S857	0.841	204-220	50793693 - 50793908	49541678-49541893	GGGCACCCATAGGTCTCT	TTTCACAGGGAGTAGGGCT
D20S1083	0.667	141-157	?	50067981-50068124	GGTGGTGATGGAGTCTGAAG	TATTTTCTATCCTTCAAGCTACCC
D20S839	0.693	204-252	51707213 - 51707456	50455198-50455441	TGCCCATCAGTGATTAGGA	GGTGAAGCTGTGACCAGAACATT
D20S833	0.510	208-261	51736774 - 51737025	50484759-50485010	CCAAGGGGATTTGCTTTTTGTTAG	GGTGACTGGGTGAGTGCC
D20S606	0.788	144-159	52247613 - 52247764	50995598-50995749	GAAACAGAGCCAACAGGGTA	CTGCAGACAGAAGGTTGCTT
D20S183	0.550	253-263	52695461 - 52695713	51443446-51443698	TGCACATAAACAGCCAGC	CCGGGATACCGACATTG
D20S840	0.820	123-165	52832775 - 52832933	51580760-51580918	CCATGAAATGGGTTGAAGTC	GGCAAATCCAGCCTCAC
D20S211	0.650	134-158	52854097 - 52854236	51602082-51602221	TTGGAATCAATGGAGCAAAA	AGCTTTACCCAATGTGGTCC
D20S1148	0.500	217	56826485 - 56826706	?	GAAATCTTAGCATGCCTCCA	AAATATCACACAGACACATGTGC
D20S430	0.727	215	56835482 - 56835680	55583467-55583665	GAATTCTGCCTGGGCAGTG	GGAACAATGAATACAAGGGTG
D20S1102	-	140	57705761 - 57705898	56453746-56453883	GAAGAGTTTCTCTTCCCTTGC	CGCCTAGGTCCAAGTCTGAG
D20S164	0.667	205	57738777 - 57738965	56486762-56486950	ATGAGGCTGGCAGACTCG	GGGTGCTAGGTGTGCTCA
D20S496	-	206-207	57921598 - 57921802	56669583-56669787	GGCTGAACAGTTTGAAGATATGG	TGCTGCCTGAAAAAGGAAGT
D20S94	0.900	140	58180867 - 58181010	56928852-56928995	GAACCAAGGAAGTTGTTCAAC	TTGCTCCAACCAGGAGGCA
D20S93	1.000	370	59604877 - 59605195	58352862-58353180	TTCCTGATCAGTACCATGTA	CAGCCTGGGTGACAGAGAA

<sup>1</sup>-Ensembl: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/textview?species=Homo\\_sapiens&idx=Marker&q=](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/textview?species=Homo_sapiens&idx=Marker&q=)

<sup>2</sup>-National Center for Biotechnology Information (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unists&cmd=search&term=>

Tabela 4: Seqüência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o gene VAP-B e suas respectivas condições de amplificação.

Nome	Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores		Tamanho (pb)
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	
VAP-B-1	CCCCGCCTTTTTGTAAACT	CTCCGTCCTTCCAGCACT	224
VAP-B-2	CAGCTCTCTTTTCCACAAACC	CTACTGTCCAGGGGCCTTCT	281
VAP-B -3	GGCACTGACAACCAAGCTCT	CATGCACCCACAATTCCATA	233
VAP-B -4	ACATCAGGGCTTTCTCATTAAAG	GAAGTCAGCAAATAAGTGGGCCT	350
VAP-B -5	CATGGTCGGTGACACTTAGGC	GTCTCAAAGGGTCCTTGGA	399
VAP-B -6	GTTGACTCCCCTTTCTGGTG	GTGTGCAGGGAGGGTAAT	360

## Capítulo 3

---

Um novo loco para uma forma de esclerose lateral amiotrófica /  
doença do neurônio motor localizada em 20q13

Agnes Lumi Nishimura, Miguel Mitne-Neto, Helga Cristina A Silva, João  
Ricardo Mendes de Oliveira, Mariz Vainzof e Mayana Zatz

Centro de Estudos do Genoma Humano, Departamento de Genética e  
Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brasil

*“A novel locus for late onset amyotrophic lateral sclerosis/motor  
neurone disease variant at 20q13”  
Journal of Medical Genetics (2004); 41(4):315-20*

## Abstract

*Amyotrophic lateral sclerosis is the most common adult onset form of motor neurone disease and involves lower and upper motor neurones. It is characterised by progressive muscle weakness and atrophy, with fasciculations associated with hyperreflexia and spasticity. About 10% of cases are familial amyotrophic lateral sclerosis, and several loci have been associated with this condition. To date, the only two genes identified have been the zinc–copper superoxide dismutase 1 (SOD1) gene, which is located on chromosome 21 (ALS1, MIM105400), and the Alsin gene, which is located at 2q33 (ALS2, MIM 205100). We report a large Brazilian Caucasian family with clinical and neurological signs compatible with the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis with slow progression. The disease seems to affect both sexes equally, with no evidence of clinical anticipation. Clinical onset occurs between age 31 and 45 years, and the cause of death is respiratory failure. Overall, 12 family members were examined personally. All patients had lower motor neurone symptoms, and five also had bulbar involvement. Electromyography, as well as muscle biopsies, showed a neurogenic pattern. We mapped a novel locus for autosomal dominant late onset amyotrophic lateral sclerosis/motor neurone disease (ALS/MND) variant at 20q13.33. The identification of a new gene for ALS/MND will contribute to our understanding of this intriguing disorder.*

## Resumo

A esclerose lateral amiotrófica é a forma mais comum de doença do neurônio motor em adultos e envolve tanto o neurônio motor superior quanto o inferior. Ela é caracterizada por fraqueza e atrofia muscular progressiva, fasciculação associada à hiperreflexia e espasticidade. Aproximadamente 10% dos casos são familiares e vários locos já foram associados a essa doença. Até o momento dois genes foram identificados, o gene *superóxido*

*dismutase 1* (SOD1), localizado no cromossomo 21 (ALS1, MIM105400) e o gene da *Alsina*, que está localizado em 2q33 (ALS2, MIM 205100). Reportamos aqui uma grande família Caucasiana brasileira (família 3 da tese) com sinais clínicos e neurológicos compatíveis com o diagnóstico de esclerose lateral amiotrófica com progressão lenta. Esta doença afeta ambos os sexos igualmente, sem evidência de antecipação clínica. A idade de início ocorre entre 31 e 45 anos levando a óbito por falência respiratória. Foram pessoalmente examinados 12 indivíduos desta família. Todos os pacientes desenvolveram sintomas de neurônio motor inferior e cinco também tiveram envolvimento bulbar. A eletromiografia, assim como a biópsia muscular revelou um padrão neurogênico. Em resumo, reportamos o mapeamento de um novo loco para uma forma autossômica dominante tardia de esclerose lateral amiotrófica/doença do neurônio motor (ELA/DNM) em 20q13.33. A identificação de um novo gene para ELA/DNM irá contribuir para o entendimento desta doença intrigante.

## Capítulo 4

---

Uma mutação no gene *VAP-B* envolvido no transporte vesicular causa atrofia muscular espinhal e esclerose lateral amiotrófica tardia

Agnes Lumi Nishimura<sup>1</sup>, Miguel Mitne-Neto<sup>1</sup>, Helga Cristina Silva<sup>1,2</sup>, Antônio Richieri-Costa<sup>3</sup>, Susan Middleton<sup>4</sup>, Duílio Cascio<sup>5</sup>, Fernando Kok<sup>1</sup>, João Ricardo Oliveira<sup>1</sup>, Tom Gillingwater<sup>4</sup>, Jeanette Webb<sup>4</sup>, Paul Skehel<sup>4</sup> e Mayana Zatz<sup>1</sup>

1. Centro de Estudos do Genoma Humano, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brasil
2. Departamento de Anestesiologia, Dor e Cuidado intensive, Escola de Medicina da Universidade Federal de São Paulo, Brasil
3. Serviço de Genética, Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo. Brasil
4. Divisão de Neurociência, Universidade de Edimburgo, Reino Unido
5. Instituto de Genômica e Proteômica, Instituto de Biologia Molecular da Universidade da Califórnia Los Angeles – Departamento de Energia

*A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis” American Journal of Human Genetics (2004); 75(5):822-31*

### **Abstract**

*ALS8 is a slowly progressive, late onset disorder with involvement of upper and lower motor neurons, bulbar and pyramidal signs. The phenotype*

*is typically one of ascending weakness, starting in the proximal muscles of the lower limbs, affecting the upper limbs after three to ten years, and often associated with dysphagia at this time. Both sexes are affected equally with no evidence of clinical anticipation. Linkage analysis allowed us to map the disease gene at 20q13.3 and a missense mutation 166C>T (P56S) was found in the vesicle-associated membrane protein / synaptobrevin - associated membrane protein B (VAP-B).*

## Resumo

A ELA8 é uma doença do tipo tardia com lenta progressão e apresenta o comprometimento tanto dos neurônios motores superiores quanto dos inferiores, apresentando ainda sinais bulbares e piramidais. O fenótipo é tipicamente do tipo ascendente, isto é, com fraqueza muscular inicialmente dos músculos proximais dos membros inferiores, afetando os membros superiores após três a dez anos e disfagia associada nesta fase. Ambos os sexos são igualmente afetados sem evidência clínica de antecipação. A análise de ligação nos permitiu mapear o novo gene no cromossomo 20q13.3 e uma mutação *missense* 166C>T (P56S) foi encontrada no gene *vesicle-associated membrane protein / synaptobrevin - associated membrane protein B (VAP-B)*.

## Capítulo 5

---

*Efeito fundador para esclerose lateral amiotrófica (ELA8) na  
população brasileira*

---

Agnes L. Nishimura<sup>1</sup>, Ammar Al-Chalabi<sup>2</sup> e Mayana Zatz<sup>1</sup>

1. Centro de Estudos do Genoma Humano, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil
2. Departamento de Neurologia, Instituto de Psiquiatria, King's College Londres, Reino Unido

*“A common founder for amyotrophic lateral sclerosis  
type 8 (ALS8) in the Brazilian population”*

*Human Genetics (2005);118(3-4):499-500*

## Abstract

*The P56S mutation in the VAP-B gene causes ALS8. Eight families, comprising more than 1,500 individuals of whom about 200 are affected, are now known to carry this mutation. Seven are of Portuguese– Brazilian ancestry and one of African–Brazilian ancestry. Haplotype analysis shows a common founder for all families regardless of ancestry, with a founding event 23 generations ago (95% CI 13–39), consistent with the Portuguese colonization of Brazil.*

## Resumo

A mutação P56S no gene *VAP-B* é responsável pela ELA8. Oito famílias com mais de 1500 indivíduos, dos quais mais de 200 são portadores desta mutação foram estudadas no presente trabalho. Sete destas famílias são caucasianas com descendência portuguesa e uma delas é negróide. Os dados históricos e a análise de haplótipo apontaram um ancestral comum. A idade aproximada para o evento fundador foi há 23 gerações (95% IC 13-39), entre 1400-1500 DC, consistente com a colonização Portuguesa no Brasil.

## Capítulo 6

---

---

## Inativação da proteína VAP-B utilizando o RNA de interferência

Agnes Lumi Nishimura<sup>1,2</sup>, Kwok-Fai Lau<sup>3</sup>, Bradley Smith<sup>2</sup>, Steve Banner<sup>2</sup>, Christopher Miller<sup>3</sup>, Mayana Zatz<sup>1</sup> and Christopher Shaw<sup>2</sup>

**6.** Centro de Estudos do Genoma Humano, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brasil

**7.** Laboratório de Neurologia - Doença do Neurônio Motor/Esclerose Lateral amiotrófica, Departamento de Neurologia do Instituto de Psiquiatria do King's College, Universidade de Londres, Grã-Bretanha

**8.** Departamento de Neurociência e Neurologia do Instituto de Psiquiatria do King's College, Universidade de Londres, Grã-Bretanha

**Formatados:** Marcadores e numeração

### Resultados preliminares

### Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis 8 (ALS8) is a progressive neurodegenerative disorder caused by a mutation in the VAP-B (VAMP-associated protein B) gene. The VAP-B function is not completely known but it seems to be involved in intracellular membrane trafficking associated to lipids homeostasis. In this study we inhibited VAP-B expression through RNA interference.

## Resumo

A esclerose lateral amiotrófica tipo 8 (ELA8) é uma doença neurodegenerativa causada por uma mutação no gene *VAP-B* (VAMP-associated protein B). A função deste gene não é totalmente compreendida, entretanto acredita-se que esteja envolvida no transporte intracelular associado a homeostase de lipídeos. O presente trabalho visa à inibição da expressão da proteína VAP-B por meio de RNA de interferência.

## Introdução

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) pertence a um grupo de doenças denominadas “Doença do neurônio motor”.

Na ELA ocorre o envolvimento dos neurônios motores superiores e inferiores além de envolvimento bulbar. Até o momento, foram identificados 8 locos para a forma familiar da ELA e neste capítulo iremos abordar especificamente a ELA tipo 8.

A ELA8 é uma doença genética (MIM [608627](#)), que foi identificada em uma grande família brasileira (ver capítulos 3 e 4). É causada por uma mutação no éxon 2 do gene *vesicle-associated membrane protein – associated protein B (VAP-B)*, que está localizado no cromossomo 20 (Nishimura et al., 2004). Este gene parece estar relacionado com transporte intracelular e recentes trabalhos demonstraram que a VAP-B está envolvida no metabolismo de lipídeos (Amarilio et al., 2005).

O objetivo deste trabalho é estudar o efeito da inibição da expressão desta proteína por meio do RNA de interferência (RNAi). Para isso o primeiro passo é conseguir dominar a tecnologia para inativar a proteína. Os resultados preliminares sugerem que foi possível inativá-la utilizando como modelo as células de ovário de hamster chinês (CHO).

### **Materiais e métodos**

Foram utilizados nesse projeto três pares de oligonucleotídeos como alvos para a ação do RNAi (ver seção 2.6.1 do capítulo 2).

A construção dos oligonucleotídeos foi baseada em programas desenvolvidos pelas empresas Ambion e Promega. Três seqüências foram selecionadas considerando-se o seguinte critério:

- 30-50% C/G
- Seqüências conservadas em humanos, camundongos e ratos
- Seqüências específicas do gene *VAP-B*

Estes oligos foram inseridos no vetor *pSuper.gfp/neo* (Oligoengine, Cat. N. VEC-PBS-0005/0006) e transformados em bactérias competentes. As colônias foram selecionadas e a inserção dos oligos no vetor *pSuper.gfp/neo* foi confirmada utilizando enzimas de restrição e seqüenciamento direto.

O esquema do processamento dos oligonucleotídeos e o funcionamento dos siRNA (*small interfering RNA*) pode ser visualizado na figura 13.

As células CHO (*Chinese Hamster Ovary*) foram cultivadas em condições apropriadas (ver seção 2.5 do capítulo 2).

As células de hamster apresentam uma proteína homóloga a VAP-B humana e no início dos experimentos não havia um anticorpo eficiente capaz de reconhecer a proteína endógena. Para tentar contornar esse

problema decidiu-se super expressar a proteína VAP-B e inibir a expressão da mesma utilizando o mecanismo de RNA de interferência.

A seqüência completa da VAP-B foi inserida no vetor pCINeo (Cat. N. E1841, Promega). Uma seqüência do gene *Myc* foi inserida na porção final do gene *VAP-B* e dessa forma foi possível verificar os efeitos da inativação da VAP-B utilizando os anticorpos anti-Myc e anti-VAP-B.

As células CHO foram mantidas em cultura e transfectadas com lipofectamina (Invitrogen cat N.18324-020) tanto com a VAP-B humana quanto com o plasmídeo contendo as seqüências alvo para o RNAi.

O lisado celular foi obtido 48 horas após transfecção e foi submetido à eletroforese de proteínas (*western blot*) ver seção 2.6.4 do capítulo 2.

Neste trabalho foram utilizados os anticorpos anti-VAP-B (gentilmente cedido pelos Dr. Kwok-Fai Lau e Dr. Christopher Miller), Myc-tag (9B11 – Cat. N. 2276 – New England Biolabs) e actina (C-11, Cat N. sc-1615 – Santa Cruz Biotechnology, Inc).

### **Resultados preliminares e discussão**

Os resultados preliminares demonstram que dos três oligos utilizados nesse experimento a seqüência denominada RNAi-1 se mostrou eficiente 48 horas após a transfecção (Figura 14, linha 3) tanto para o anticorpo anti-VAP-B quanto para o anti-Myc. Os vetores contendo os insertos RNAi-2 e RNAi-3 mantiveram-se inalterados (Figura 14, linhas 4 e 5). Os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes e os resultados foram idênticos.

Baseado nos resultados preliminares acredita-se que o oligo RNAi-1 é o ideal para futuros experimentos. Os resultados mostram que a superexpressão da proteína VAP-B humana seguida de sua inativação por ação do RNA de interferência foi realizada com sucesso. Entretanto deve-se ressaltar que este experimento deverá ser repetido utilizando outros tipos celulares humanos ou de camundongo como, por exemplo, células *Hela* ou mesmo neurônios corticais de camundongo, na tentativa de se inativar a proteína endógena.

Inicialmente optou-se por realizar os experimentos com células CHO, pois não havia disponível um anticorpo capaz de reconhecer a VAP-B endógena. Atualmente já dispomos deste anticorpo e o próximo passo é tentar inativar a proteína humana e verificar os seus efeitos na célula.

A inativação da proteína VAP-B selvagem e da mutante P56S será importante para entendermos qual a verdadeira função desta proteína na célula. Sabe-se que a forma mutante forma agregados celulares, que podem ser a causa da ELA8. A compreensão do mecanismo patológico desta doença abrirá novas portas para futuros tratamentos para a ELA8 e outras desordens envolvidas com transporte intracelular.

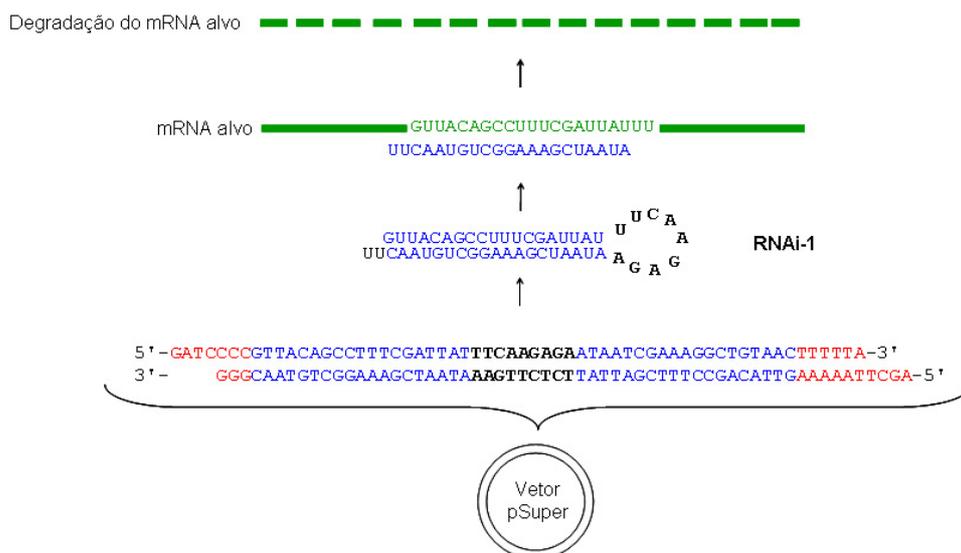


Figura. 13: esquema da ação do RNA de interferência. Inicialmente os oligonucleotídeos são inseridos no vetor pSuper. Ocorre a produção de pequenos RNA de interferência (*small interfering RNA - siRNA*) dentro da célula, que irão hibridar com a seqüência alvo. Isto ativará o mecanismo celular que reconhecerá o RNA dupla fita como algo patogênico, degradando assim a seqüência alvo.

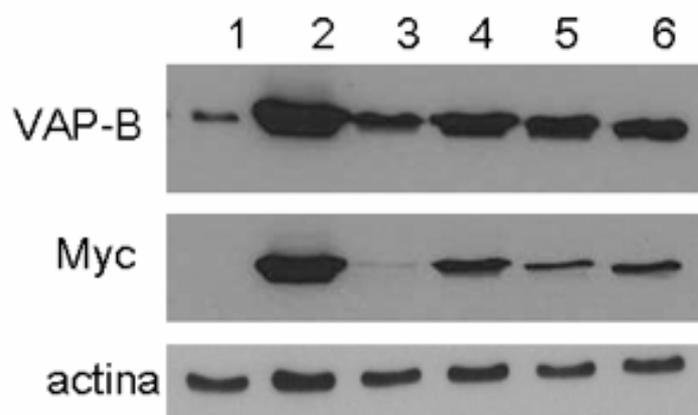


Figura 14: Eletroforese de proteínas (*western blot*) em gel 10%. As amostras foram hibridadas com anticorpos anti-VAP-B, anti-Myc e anti-actina. 1= lisado celular de células CHO não tratadas, 2= super-expressão da VAP-B humana, 3= super-expressão da VAP-B humana tratada com RNAi-1, 4= super-expressão da VAP-B humana tratada com RNAi-2, 5= super-expressão da VAP-B humana tratada com RNAi-1 e 6= super-expressão da VAP-B humana tratada com vetor *pSuper.gfp/neo*.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem em especial à Constância Urbani, Emiliano Peña-Altamira, Lisa Williams, Naghmeh Fouladi, Paul e Maria. Apoio financeiro FAPESP, CEPID, MNDA e MRC.

## INTRODUÇÃO

### **Doença de Alzheimer**

Agnes L Nishimura<sup>1</sup>, João RM Oliveira<sup>2</sup>, Mayana Zatz<sup>1</sup>

1. Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP), Brasil
2. Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

*Capítulo adaptado de “Doença de Alzheimer: Diferenças étnicas nos genes de susceptibilidade” publicado em Alzheimer Hoje, 3: 21-27, 2002*

## 7.1. Doença de Alzheimer: Diferenças étnicas nos genes de susceptibilidade

Após o seqüenciamento do Genoma Humano, os pesquisadores do mundo inteiro têm se dedicado ainda mais a estudar as doenças complexas e de herança multifatorial. Dentre elas, destaca-se a Doença de Alzheimer (DA).

Acredita-se que a DA é responsável por cerca de 50 a 70% dos casos de demência em idosos acima dos 65 anos. Ela é caracterizada por uma deterioração progressiva da memória, associada às perdas de neurônios em regiões encefálicas e circuitos neuronais de cognição e memória, incluindo os neurônios do córtex, hipocampo, amígdala e sistema colinérgico.

A disfunção e morte de neurônios neste circuito neuronal reduz o número de sinapses gerais e específicas, isolando o hipocampo e os lóbulos parietais, evitando a formação de novas memórias. Observa-se ainda atrofia encefálica que pode ser demonstrada por tomografia computadorizada ou por ressonância magnética, com alargamento dos sulcos e estreitamento dos giros cerebrais, acompanhadas por déficit de diferentes neurotransmissores como a serotonina, nor-epinefrina, acetilcolina entre outros.

## 7.2. Formas familiares, as placas amilóides e os emaranhados neurofibrilares

Uma forma de se classificar a DA é em relação ao início dos sintomas. A forma precoce ou *Early Onset alzheimer Disease* (EOAD), inicia-se antes dos 65 anos, tem herança autossômica dominante e é identificada em grupos familiares específicos. Essa forma corresponde a aproximadamente 10% dos casos.

Até o momento foram identificadas várias mutações em três genes: *Proteína Precursora Amilóide (APP)*, *Presenilina 1 (PS1)* e *Presenilina 2 (PS2)*, localizados nos cromossomos 21, 14 e 1 respectivamente.

Uma das características histopatológicas principais da DA é a formação das placas amilóides ou senis (figura 15 a e b). O mecanismo da formação das placas amilóides ainda permanece obscuro. Postula-se que durante o processamento da proteína amilóide ocorre uma clivagem proteolítica pela ação de três isoenzimas principais, as  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -secretase, dando origem a um fragmento protéico insolúvel de 42-43 aminoácidos ( $A\beta_{42-43}$ ) que seria depositado, formando-se assim as placas amilóides (fig 15 e 16).

As Presenilinas também estariam de alguma forma relacionadas nesse processamento do peptídeo A $\beta$ <sub>42-43</sub> e alguns autores sugerem que estas proteínas, quando mutadas, agiriam como as secretases durante o processo proteolítico (Xia, 2001).

Outra característica histopatológica marcante em pacientes com DA é a presença de filamentos helicoidais emparelhados (fig 15 c e d) formados primariamente pela presença de proteína tau hiperfosforilada (ver seção hipótese amilóide 7.4.2).

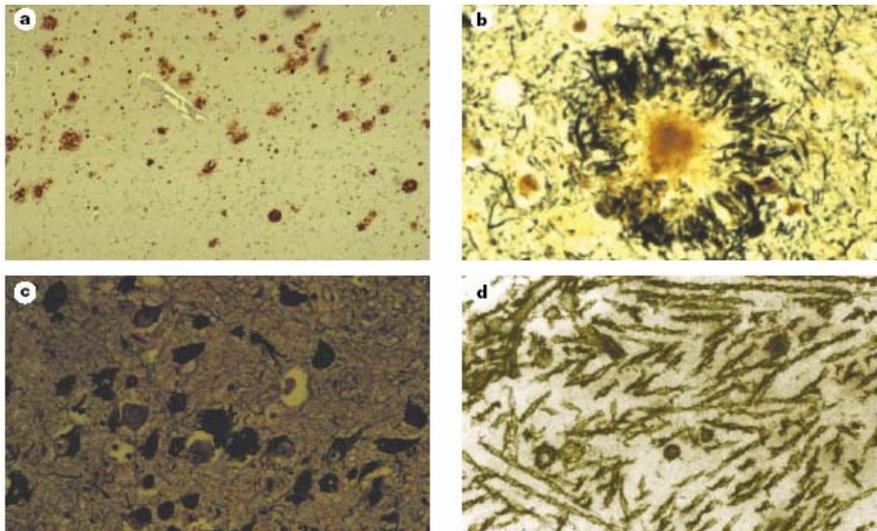


Figura. 15: Neuropatologia da Doença de Alzheimer. a) Placas amilóides (senis) coradas com anticorpo contra o peptídeo  $\beta$ -amilóide (marrom) no córtex de pacientes com Doença de Alzheimer (aumento de 20X). b) Uma placa amilóide em maior aumento. O núcleo central é composto de fibras A $\beta$  rodeado de um halo de terminais nervosos com depósito de proteína tau hiperfosforilada (aumento de 40X). c) Emaranhados neurofibrilares (preto) em corpo celular em neurônios piramidais corticais (aumento de 20X). d) microscopia eletrônica de emaranhados neurofibrilares reunidos com filamentos helicoidais emparelhados (aumento de 40X) (Sisodia e St George-Hyslop, 2002).

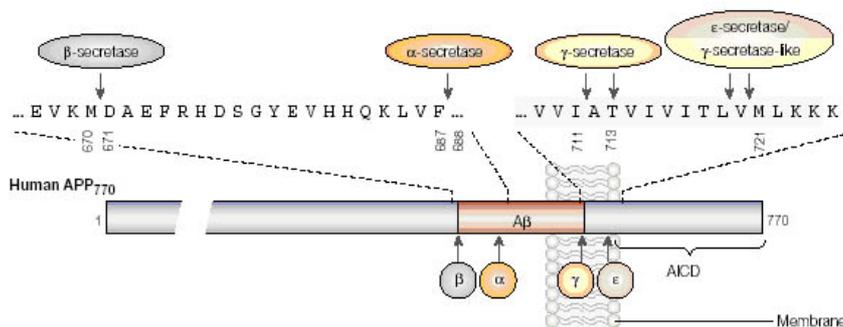


Figura. 16: Esquema representando a proteína precursora beta-amilóide (APP) e os sítios de clivagem das enzimas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -secretase. A enzima  $\gamma$ -secretase é crucial para a formação do peptídeo  $A\beta_{42-43}$ , insolúvel e principal componente da placa amilóide em pacientes com doença de Alzheimer (Sisodia e St George-Hyslop, 2002).

### 7.3. Casos isolados e fatores de susceptibilidade para DA

A forma tardia ou *Late Onset alzheimer Disease* (LOAD), por definição ocorre após os 65 anos e corresponde a 90% dos relatos em DA. Em geral a forma tardia ocorre em casos isolados, isto é, não há histórico da doença na família.

Nas formas isoladas podemos observar a formação das placas amilóides e dos emaranhados neurofibrilares. Além disso, os sintomas e sinais são idênticos aos observados em casos familiares. Os dois grupos diferem quanto à idade de início e o padrão de herança.

Acredita-se que em casos isolados o padrão de herança é multifatorial, com contribuição tanto de fatores genéticos quanto ambientais.

Mutações novas nos genes conhecidos para as formas familiares (*APP*, *PS1* e *PS2*), fatores genéticos ainda não determinados, fatores ambientais como o fumo, estresse, exposição a metais pesados como o alumínio, e outros podem ser os responsáveis pela LOAD.

O principal fator genético para a forma tardia de DA é a *Apolipoproteína E* (*ApoE*), localizado em 19q13.

A ApoE é uma glicoproteína que está envolvida no transporte de colesterol e no metabolismo de lipoproteínas. Ela apresenta dois polimorfismos nas posições 112 e 158 da proteína produzindo três variantes distintas: ApoE- $\epsilon$ 2 (Cys112/Cys158), ApoE- $\epsilon$ 3 (Cys112/Arg158) e ApoE- $\epsilon$ 4 (Arg112/Arg158).

Acredita-se que a isoforma ApoE- $\epsilon$ 2 atue como um fator de proteção contra a DA, enquanto que a ApoE- $\epsilon$ 4 seria um fator de predisposição. O mecanismo pelas quais estas isoformas modulam a DA não é completamente compreendido, entretanto verificou-se que a variante ApoE- $\epsilon$ 4 apresenta maior afinidade ao peptídeo  $A\beta_{42-43}$  que as isoformas ApoE- $\epsilon$ 2 e ApoE- $\epsilon$ 3 (Sanan *et al.*, 1994), favorecendo assim o acúmulo protéico intracelular.

Observa-se em estudos do tipo Caso-Controle, que a ApoE- $\epsilon$ 4 está presente tanto em pacientes quanto em controles normais representando, portanto, um importante fator de susceptibilidade. Além disso, ela não é necessária nem suficiente para o desenvolvimento de DA e outros fatores ainda não conhecidos podem estar atuando na patogênese da doença.

Apesar de esta variante ser um importante fator de risco para a DA, ela pode ser observada em outras doenças, como por exemplo, hipercolesterolemia, doenças cardiovasculares, diabetes e retinopatia. (Greenow *et al.*, 2005; Messier, 2003).

A ApoE é o fator de susceptibilidade mais estudado em DA e verificou-se que os resultados são consistentes em diferentes populações. Outros polimorfismos estudados em DA não parecem representar importantes fatores de risco para esta patologia (tabela 9).

Nos últimos anos vários grupos têm se focado na identificação de novos genes ou locos de susceptibilidade para a DA. Contudo, os resultados são controversos. A grande maioria dos polimorfismos relacionados com a DA estão sendo replicados em diferentes populações e com um número maior de pacientes. No entanto é provável que vários polimorfismos tenham um diferente grau de importância para a manifestação e evolução do quadro demencial em diferentes grupos étnicos.

Baseado na dificuldade de se estudar os polimorfismos de risco na DA, Bertram *et al.* criaram o **AlzGene Database** (<http://www.alzforum.org/res/com/gen/alzgene/>), que contém os mais recentes estudos de associação em DA em diferentes populações.

#### 7.4. Hipóteses para a DA

Atualmente existem várias hipóteses para se explicar a patogênese da Doença de Alzheimer. Dentre elas destacam-se: hipótese da proteína tau, hipótese amilóide e outras.

##### 7.4.1 Hipótese da proteína tau

Esta hipótese está relacionada com a ação da proteína tau.

Esta proteína se liga diretamente ao microtúbulo, estabilizando-o. A hiperfosforilação da proteína tau desestabiliza o microtúbulo levando a despolimerização do mesmo, causando acúmulo da proteína e formação dos filamentos helicoidais emparelhados (figura 15 e 17). Estes elementos se acumulam nos neurônios e se transformam em emaranhados neurofibrilares. O acúmulo anormal desta proteína leva à morte celular.

Esses filamentos não são exclusivos da DA e podem ser observadas em outras doenças, como por exemplo, a demência fronto-temporal (MIM, [600274](#)). Alguns autores sugerem classificar a presença de filamentos helicoidais emparelhados em uma nova classe de doenças, as chamadas “tautopatias” (Brandt *et al.*, 2005).

Stamer *et al* 2002 demonstrou que níveis elevados de tau podem inibir o transporte intracelular em neurônios, principalmente o transporte axonal mediado pela quinesina. Essa inibição é crítica para as organelas como o peroxissomo, mitocôndria e o transporte de vesículas, aumentando à possibilidade de estresse oxidativo e formação de agregados celulares.

#### 7.4.2. Hipótese amilóide

A hipótese mais aceita para a patogênese de DA é a hipótese amilóide.

Sabe-se que as placas amilóides são observadas em todo o encéfalo de indivíduos normais e pacientes com DA. Entretanto, neste último grupo a quantidade é muito maior e elas estão localizadas primariamente no córtex, amígdala e hipocampo.

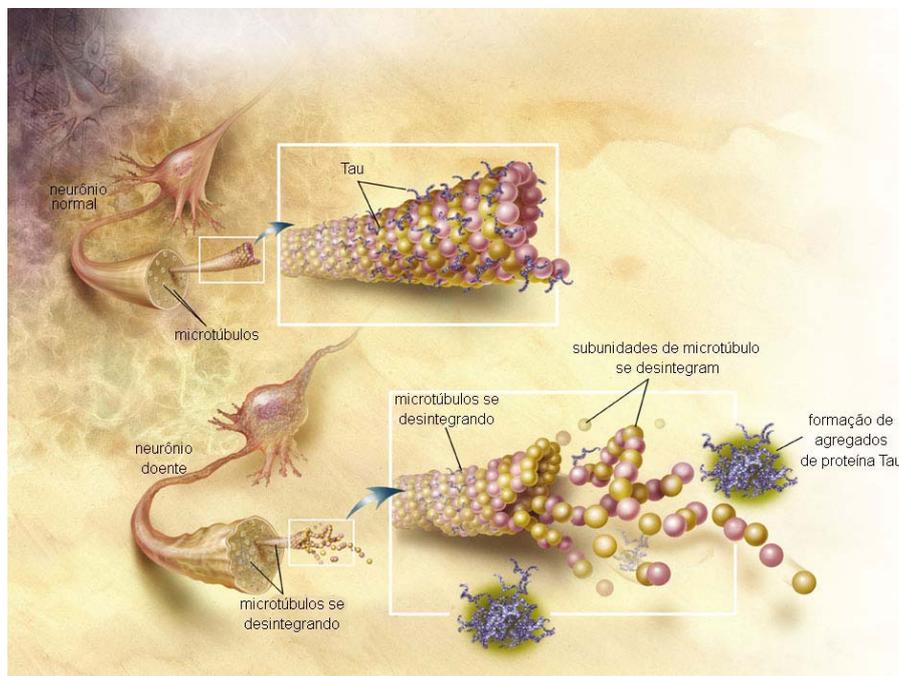


Figura. 17: Proteína tau e doença de Alzheimer. A principal função da proteína tau é dar estabilidade ao microtúbulo. A hiperfosforilação da proteína tau impede a sua ligação ao microtúbulo formando os filamentos helicoidais emparelhados. Com isso, ocorrerá a desestabilização e desintegração do microtúbulo. (<http://www.alzheimers.org/rmedia/graphicslowres.htm>).

Acredita-se que o acúmulo do peptídeo A $\beta$  seja o fator inicial comum que leva a neurodegeneração da Doença de Alzheimer. Inicialmente todos

os genes que são conhecidos por aumentar o risco em desenvolver esta patologia modulam de alguma forma a formação de A $\beta$ . Além disso, o acúmulo deste peptídeo insolúvel pode ser visualizado em indivíduos pré-sintomáticos portadores de mutações conhecidas nos genes *APP*, *PS1* e *PS2* e em indivíduos portadores de Síndrome de Down.

Ainda não é conhecido como a A $\beta$  causa a degeneração em DA.

Além disso, a hiperfosforilação da proteína tau é um fator importante para esta patologia, mas não se conhece a relação direta entre estas proteínas e nem qual delas é o fator desencadeador da DA. Alguns autores acreditam que a formação das placas amilóides precede a formação de filamentos helicoidais emparelhados (Oddo *et al.*, 2003). Sabe-se entretanto que a proteína tau hiperfosforilada sozinha é neurotóxica e isto pode ser observado em diferentes doenças neurológicas.

### 7.4.3. Outras hipóteses

Acredita-se ainda que outros fatores podem modular o aparecimento dos sintomas. Mudanças nos níveis de cálcio e danos à membrana celular podem ser fatores adicionais para o desenvolvimento da DA, pois causam a morte celular.

O estresse oxidativo e a ação dos radicais livres, por meio dos EROS (espécies reativas de oxigênio), tornaria o pH ácido e favoreceria o depósito da proteína de beta-amilóide e conseqüentemente a formação das placas senis.

A hipótese inflamatória consiste na interação de proteínas envolvidas na via inflamatória e da proteína beta-amilóide. Os fatores neurotróficos, a ativação da microglia e do astrócito são alguns exemplos dessa hipótese. O mecanismo não é totalmente compreendido.

Mudanças neuroquímicas, déficit do sistema serotoninérgico e colinérgico também estão envolvidas na DA. Sabe-se que a serotonina está diminuída em algumas regiões do encéfalo e que pacientes com DA apresentam uma diminuição da atividade de nor-epinefrina e dopamina. Além disso, ocorre uma diminuição de 30 a 90% da biossíntese da enzima acetilcolinotransferase no córtex e no hipocampo dos pacientes com DA. Este mecanismo também não é totalmente conhecido.

### 7.5. Vacina para a doença de Alzheimer?

Apesar de haver muitas dúvidas quanto a patogênese da DA, acredita-se que a A $\beta$  é o principal alvo para tratamentos contra essa doença. Na última década diversos trabalhos têm procurado uma forma de terapia para a Doença de Alzheimer evitando o acúmulo do peptídeo tóxico com o uso de inibidores de  $\beta$ -amilóide.

O uso de anticorpos contra a A $\beta$  tem se mostrado eficaz em modelos animais nos últimos anos (Schenk *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 2000; Oddo *et al.*, 2003).

Até recentemente os modelos animais existentes apresentavam ou a formação das placas amilóides ou a presença dos filamentos helicoidais emparelhados.

Oddo *et al.*, 2003 desenvolveram camundongos triplo transgênico portadores de três mutações (PS1<sup>M146V</sup>, APP<sup>Swe</sup> e tau<sup>P301L</sup>). Os animais apresentaram uma doença neurodegenerativa progressiva, com formação das placas amilóides antes da formação dos emaranhados fibrilares, consistente com a hipótese amilóide. Os achados histopatológicos foram verificados no córtex, amígdala e hipocampo dos animais, processo similar ao encontrado em pacientes com DA.

Os autores injetaram anticorpos contra a  $\beta$ -amilóide em animais de 1 ano e após 3 dias as placas amilóides desapareceram. De 5-7 dias após a injeção, a proteína tau estava presente nos neurônios, mas os emaranhados neurofibrilares também desapareceram. O uso da vacina se mostrou ineficaz em animais mais velhos nos quais as placas amilóides já estão formadas.

Os primeiros resultados obtidos em animais vacinados contra a beta-amilóide criou uma expectativa muito grande para o tratamento da doença de Alzheimer. Deu-se início então aos testes em pacientes com DA.

Aproximadamente 300 pacientes foram selecionados e tratados com uma vacina para evitar a formação da A $\beta$ , entretanto 6% deles desenvolveram meningoencefalite e os testes foram abandonados (Schenk *et al.*, 2004 - revisão).

Até o momento não existe um tratamento eficaz para a DA e a procura por medicamentos capazes de inibir o desenvolvimento da doença tem se intensificado nos últimos anos. Acredita-se que novas vacinas contra a A $\beta$  combinadas com fatores neurotróficos podem ser eficazes para combater o acúmulo de beta amilóide em pacientes com Doença de Alzheimer.

## 7.6. Objetivo

- Estudos de associação em pacientes brasileiros com Doença de Alzheimer

Tabela 9: Alguns genes ou locos de susceptibilidade para a Doença de Alzheimer

Gene ou locus de susceptibilidade	Cromossomo	Possível efeito do gene mutado ou do polimorfismo	Referência
<i>APP</i>	21	↑ depósito de A $\beta$ (42/43)	(Amtul <i>et al.</i> , 2002)
<i>PS1</i>	14	↑ depósito de A $\beta$ (42/43)	(Amtul <i>et al.</i> , 2002)
<i>PS2</i>	1	↑ depósito de A $\beta$ (42/43)	(Lleo <i>et al.</i> , 2001; Tomita <i>et al.</i> , 1997; Pastori <i>et al.</i> , 2000)
<i>ApoE</i>	19	↑ depósito de A $\beta$ (42/43)	(Oliveira <i>et al.</i> , 1997; Graff-Radford <i>et al.</i> , 2001; Scarmeas <i>et al.</i> , 2002)
<i>HTT gene – linked polymorphic region (5HTTLPR)</i>	17	↑ susceptibilidade de DA através da ↓ da atividade transcricional do gene do transportador da serotonina	(Collier <i>et al.</i> , 1996; Lesch <i>et al.</i> , 1996; Oliveira <i>et al.</i> , 1998; Hu <i>et al.</i> , 2000; Kunugi <i>et al.</i> , 2001)
<i>A2M</i> (A2 macroglobulina)	12	Relacionado com a ligação, degradação e clearance de A $\beta$	(Craddock e Lendon, 1998; Bullido <i>et al.</i> , 2001; Poduslo e Yin, 2001; Shibata <i>et al.</i> , 2004)
<i>LRP1</i> (low density lipoprotein receptor-related protein 1)	12	Receptor de ApoE e outras lipoproteínas	(Craddock e Lendon, 1998; Bullido <i>et al.</i> , 2001; Poduslo e Yin, 2001)
<i>DXS1047</i>	X	?	(Zubenko <i>et al.</i> , 1998; Zubenko <i>et al.</i> , 1999; Nishimura <i>et al.</i> , 2000)
<i>D10S1423</i>	10	?	(Zubenko <i>et al.</i> , 1998; Zubenko <i>et al.</i> , 1999; Majores <i>et al.</i> , 2000; Nishimura <i>et al.</i> , 2000)
<i>BDNF</i> (Brain derived neurotrophic factor)	11p13	?	(Kunugi <i>et al.</i> , 2001; Riemenschneider <i>et al.</i> , 2001; Nishimura <i>et al.</i> , 2004; Lee <i>et al.</i> , 2005; Olin <i>et al.</i> , 2005)
<i>IDE</i> (insulin degrading enzyme)	10	Degradação e clearance do A $\beta$	(Qiu <i>et al.</i> , 1998; Chesneau <i>et al.</i> , 2000; Bousquet <i>et al.</i> , 2002; Edland <i>et al.</i> , 2003; Bian <i>et al.</i> , 2003; Edland, 2004; Sakai <i>et al.</i> , 2004; Feuk <i>et al.</i> , 2004; Nowotny <i>et al.</i> , 2005)
<i>Complexo das Interleucinas 1</i>	2q14-2q14.2	?	(Nicoll <i>et al.</i> , 2000; Ki <i>et al.</i> , 2001; Combarros <i>et al.</i> , 2002; Fidani <i>et al.</i> , 2002; Green <i>et al.</i> , 2002; Ebrahimi <i>et al.</i> , 2003; Kuo <i>et al.</i> , 2003; Tsai <i>et al.</i> , 2003; Li <i>et al.</i> , 2004; Mcculley <i>et al.</i> , 2004; Seripa <i>et al.</i> , 2004)
<i>TNFA</i> (Fator de necrose tumoral alfa)	6	?	(Mccusker <i>et al.</i> , 2001; Alvarez <i>et al.</i> , 2001; Culpan <i>et al.</i> , 2003; Shibata <i>et al.</i> , 2004; Lavie <i>et al.</i> , 2005)
<i>uPA</i> (Urokinase-type plasminogen activator) ou <i>PLAU</i>	10	?	(Finckh <i>et al.</i> , 2003; Bagnoli <i>et al.</i> , 2005; Papassotiropoulos <i>et al.</i> , 2005)

Ubeclin 1 (*UBQLN1*)

9q22

Interação com a PS1 e PS2

(Bertram *et al.*, 2005; Slifer *et al.*, 2005)

## Capítulo 8

---

Ausência de associação entre o polimorfismo C-270T do gene fator neurotrófico derivado do cérebro e pacientes brasileiros com doença de Alzheimer do tipo tardio

Agnes Lumi Nishimura<sup>1</sup>, João Ricardo Mendes de Oliveira<sup>2</sup>, Miguel Mitne-Neto<sup>1</sup>, Camila Guindalini<sup>1</sup>, Ricardo Nitrini<sup>3</sup>, Valéria Santoro Bahia<sup>3</sup>, Paulo Roberto de Brito-Marques<sup>4</sup>, Paulo Alberto Otto<sup>1</sup> e Mayana Zatz<sup>1</sup>

1. Centro de Estudos do Genoma Humano, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brasil
2. Departamento de Neurologia da Escola de Medicina David Geffen, Universidade da Califórnia Los Angeles, EUA
3. Departamento de Neurologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Brasil
4. Centro de Neurologia do Comportamento, Faculdade de Ciências Médicas, Brasil

*“Lack of association between the brain-derived neurotrophin factor (C-270T) polymorphism and late-onset Alzheimer's disease (LOAD) in Brazilian patients”*  
*Journal of Molecular Neurosciece (2004);22(3):257-60*

### **Abstract**

*After the identification of the apolipoprotein E gene isoform (APOE-epsilon4) as a risk factor for late-onset Alzheimer's disease (LOAD), the search for other polymorphisms associated with AD has been undertaken by many groups of investigators around the world. These studies have shown*

*controversial results in many populations. More recently, a single nucleotide polymorphism in the promoter region of the brain-derived neurotrophin factor (BDNF) was found to be a risk factor for AD in two independent population studies. Here we report the analysis of this polymorphism in a group of 188 LOAD Brazilian patients compared to matched normal controls. A strong association between the ApoE- $\epsilon$ 4 polymorphism and LOAD was observed, but there was no significant association between this BDNF polymorphism and affected patients. The possibility that other polymorphisms or mutations in this gene play a role in the development of AD cannot be ruled out. However, the results of the present study suggest that in opposition to the two reported studies, this polymorphism does not seem to be implicated in LOAD Brazilian patients. It also shows the importance of replication studies in different populations, as susceptibility loci might differ in different ethnic groups; this will have important implications in future treatments with pharmacological agents.*

## Resumo

Após a identificação da isoforma no gene Apolipoproteína E (*APOE-epsilon4*) como um risco para a forma tardia da Doença de Alzheimer (DA), a procura por outros polimorfismos associados a DA tem sido realizada por muitos grupos no mundo inteiro. Estes estudos têm mostrado resultados controversos em diferentes populações. Recentemente um polimorfismo de um único nucleotídeo na região promotora do fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês BDNF) foi identificado como um fator de risco para a DA em dois estudos independentes utilizando populações diferentes. Neste trabalho, reportamos a análise deste polimorfismo em 188 pacientes brasileiros com a forma tardia de DA, comparando-se com controles normais. Uma associação positiva foi encontrada entre o polimorfismo ApoE- $\epsilon$ 4 e pacientes com DA, entretanto não foi identificada associação significativa entre o polimorfismo no BDNF e pacientes brasileiros. A possibilidade de outros polimorfismos ou mutações neste gene atuarem na patogênese da DA não deve ser descartada. Entretanto nossos dados sugerem que ao contrário dos resultados obtidos previamente, este polimorfismo não parece estar

envolvido na Doença de Alzheimer e em pacientes brasileiros. Isto demonstra mais uma vez a importância em se replicar este tipo de estudo em diferentes populações. Fatores de susceptibilidade podem atuar diferentemente em grupos étnicos distintos, o que implica em futuros tratamentos com agentes farmacológicos.

## Capítulo 9

---

---

Polimorfismo no gene Monoamino Oxidase em pacientes  
brasileiros: um fator de risco para a forma tardia de doença de  
Alzheimer?

Agnes Lumi Nishimura<sup>1</sup>, Camila Guindalini<sup>1</sup>, João Ricardo Mendes de  
Oliveira<sup>2</sup>, Ricardo Nitrini<sup>3</sup>, Valéria Santoro Bahia<sup>3</sup>, Paulo Roberto de Brito-  
Marques<sup>2</sup>, Paulo Alberto Otto<sup>1</sup> e Mayana Zatz<sup>1</sup>

5. Centro de Estudos do Genoma Humano, Departamento de Genética e  
Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São  
Paulo, Brasil
6. Centro de Neurologia do Comportamento, Faculdade de Ciências  
Médicas, Brasil
7. Departamento de Neurologia, Faculdade de Medicina, Universidade de  
São Paulo, Brasil

*“Monoamine oxidase a polymorphism in brazilian patients: risk  
factor for late-onset Alzheimer's disease?”  
Journal of Molecular Neurosciece (2005); 27(2):213-7*

### **Abstract**

*Different studies have attempted to find polymorphisms involved in the serotonergic pathway that could be involved in mood disorders and late-onset Alzheimer's disease (LOAD) symptoms. Here, we compared the frequency of two polymorphisms: monoamine oxidase A (MAOA) and serotonin transporter*

*in LOAD patients versus controls. No evidence of association was observed when these polymorphisms were compared separately; however, the combination of the MAOA allele 1 + the short allele of 5-HTTLPR + ApoE-ε4 was significantly more frequent in patients than in controls. It reinforces the hypothesis that different genes acting together might play a role in AD susceptibility. Based on these data, we suggest replicating these studies in larger samples of LOAD patients belonging to different ethnic groups*

## Resumo

Diferentes estudos têm se focado na identificação de polimorfismos envolvidos na via serotoninérgica, que pode estar envolvida em doenças do humor e na forma tardia da Doença de Alzheimer (DA). No presente trabalho, comparamos a frequência de dois polimorfismos: no gene da Monoamino oxidase A (MAOA) e no transportador da serotonina (5-HTTLPR) em pacientes com a forma tardia de DA *versus* controles. Não foi encontrada associação positiva quando estes polimorfismos foram analisados separadamente, entretanto, a combinação entre o alelo 1 da MAOA + o alelo curto do 5-HTTLPR + ApoE-ε4 foi significativamente mais freqüente me pacientes que em controles. Isto reforça a hipótese de que diferentes genes de predisposição atuem concomitantemente na DA. De acordo com os nossos resultados, sugerimos que estes estudos sejam replicados em uma amostra maior de pacientes com a forma tardia de doença de Alzheimer e em diferentes grupos étnicos.

## Capítulo 10

---

---

Ausência de associação entre os polimorfismos da Interleucina-1  
e pacientes brasileiros com Doença de Alzheimer

Agnes L Nishimura <sup>1</sup>, Miguel Mitne-Neto <sup>1</sup>, Fábio B Mury <sup>1</sup>, Natale Cavaçana  
<sup>1</sup>, Ricardo Nitri <sup>2</sup>, Valéria S Bahia <sup>2</sup>, Paulo R de Brito-Marques <sup>3</sup>, João RM  
Oliveira <sup>3</sup>, Mayana Zatz <sup>1</sup>

8. Centro de Estudos do Genoma Humano, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brasil
9. Departamento de Neurologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Brasil
10. Centro de Neurologia do Comportamento, Faculdade de Ciências Médicas, Brasil

*“No evidence of association between Interleukin-1 polymorphisms  
and Alzheimer’s disease in Brazilian patients”*

### ***Abstract***

*Several studies have attempted to find a relationship between inflammatory pathways and psychiatric disorders. Polymorphisms of the interleukin-1 (IL-1) gene complex, such as IL-1 alpha (IL-1A) and IL-1 beta (IL-1B) have been associated to different mood disorders. The IL-1 alpha gene has a base exchange at the position -889 and IL-1 beta gene has a*

*base exchange at the position -511. These polymorphisms have been associated to late onset Alzheimer disease (LOAD) pathogenesis probably inducing the translation and processing of the beta-amyloid precursor protein with possible implications on the progression of the plaque and tangle formation. In this report, we have compared the distribution of these polymorphisms in 195 clinically diagnosed LOAD patients and a control group of 188 individuals. In this study we analysed ApoE, IL-1A and IL-1B polymorphisms. As expected we found a significant association between ApoE-ε4 and LOAD, however no significant difference was found in IL-1A and IL-1B polymorphisms. These data suggest that these IL polymorphisms do not play an important role in LOAD Brazilian patients.*

## Resumo

Diferentes estudos têm sido realizados na tentativa de se identificar a relação entre a via inflamatória e doenças psiquiátricas. Os polimorfismos do complexo gênico da interleucina-1 (IL-1), como por exemplo, a IL-1 alfa (IL-1A) e IL-1 beta (IL-1B) parecem estar associados a diferentes doenças do humor. O gene da IL-1 alfa tem um polimorfismo na posição -889 e na IL-1 beta o polimorfismo se localiza na posição -511. Estas alterações têm sido associadas com a forma tardia da Doença de Alzheimer (DA) provavelmente induzindo a tradução e processamento da proteína precursora beta-amilóide com possíveis implicações na formação dos emaranhados neurofibrilares e

nas placas amilóides. Neste trabalho comparamos a distribuição destes polimorfismos em 195 pacientes clinicamente diagnosticados como portadores da DA e 188 indivíduos do grupo controle. Foram analisados polimorfismos no gene da *ApoE*, *IL-1A* e *IL-1B*. Como esperado, foi encontrada uma significativa associação entre a *ApoE-ε4* e a DA, entretanto nenhuma associação significativa entre *IL-1A* e *IL-1B*. Os dados sugerem que os polimorfismos nestes dois últimos genes não apresentam uma função importante na patologia da DA em pacientes brasileiros.

No evidence of association between Interleukin-1 polymorphisms and Alzheimer's disease in Brazilian patients

Agnes L Nishimura <sup>1</sup>, Miguel Mitne-Neto <sup>1</sup>, Fábio B Mury <sup>1</sup>, Natale Cavaçana <sup>1</sup>, Ricardo Nitrini <sup>2</sup>, Valéria S Bahia <sup>2</sup>, Paulo R de Brito-Marques <sup>3</sup>, João RM Oliveira <sup>3</sup>, Mayana Zatz <sup>1</sup>

- 1 Human Genome Research Center, Genetics and Evolutive Biology  
Department, Institute of Biosciences, University of São Paulo -IBUSP, São Paulo, Brazil
- 2 Department of Neurology of the Faculty of Medicine, São Paulo University, FMUSP, São Paulo, Brazil
- 3 Behavior Neurology Center of the Faculty of Medical Sciences, Recife,

Brazil

Correspondence to Dr. Mayana Zatz - Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo - IBUSP, São Paulo, Brazil. Rua do Matão, 277 - CEP: 05508-090.

Tel: +55 11 3091 7563

Fax: +55 11 3091 7419

E-mail: [mayazatz@usp.br](mailto:mayazatz@usp.br)

### **Abstract**

Several studies have attempted to find a relationship between inflammatory pathways and psychiatric disorders. Polymorphisms of the interleukin-1 (IL-1) gene complex, such as IL-1 alpha (IL-1A) and IL-1 beta (IL-1B) have been associated to different mood disorders. The IL-1 alpha gene has a base exchange at the position -889 and IL-1 beta gene has a base exchange at the position -511. These polymorphisms have been associated to late onset Alzheimer disease (LOAD) pathogenesis probably inducing the translation and processing of the beta-amyloid precursor protein with possible implications on the progression of the plaque and tangle formation. In this report, we have compared the distribution of these polymorphisms in 195 clinically diagnosed LOAD patients and a control group of 188 individuals. In this study we analysed ApoE, IL-1A and IL-1B polymorphisms. As expected we found a significant association between ApoE-ε4 and LOAD, however no significant difference was found in IL-1A and IL-1B polymorphisms. These data suggest that these IL polymorphisms do not play an important role in LOAD Brazilian patients.

Key words: Alzheimer's disease, susceptibility polymorphisms, IL-1 genes

Alzheimer disease (AD) is a neurodegenerative condition characterized by the presence of abnormal accumulation of beta-amyloid, neurofibrillary tangles and loss of neurons in specific regions of the brain.

To date, three genes have been associated to familial Alzheimer's disease. The presenilin 1 located at chromosome 14, presenilin 2 at chromosome 1 and amyloid precursor protein at chromosome 21.

Sporadic late onset Alzheimer's disease (LOAD) is responsible for the vast majority of AD cases with no major known gene involved. A variation in different genes may influence the susceptibility for this disease. The best studied susceptibility gene associated to LOAD is the Apolipoprotein E (ApoE), which is responsible for the production of a protein that transports cholesterol and other fats throughout the body. The etiology of all proteins involved in this form remains unknown and therefore studies attempting to find susceptibility genes are of great interest.

The Interleukin-1 (IL-1) gene cluster comprises nine genes in chromosome 2q14-2q14.2 including the proinflammatory IL-1 alpha (IL-1A) and IL-1 beta (IL-1B) [1, 2]. The IL-1A has a base exchange at position -889 (C>T) and the IL-1B has a base exchange at position -511 (C>T) [1]. These polymorphisms have been studied in several mood and neurodegenerative disorders such as dysthymia [3], schizophrenia [1, 4], Parkinson disease [5] and LOAD [6-19].

The function of these polymorphisms remains unknown; however several studies predict that in LOAD, the translation and processing of the beta-amyloid precursor protein can be induced by these variants with possible implications on the progression of the plaque and tangle formation [20].

Since results on association studies of these polymorphisms in AD have been controversial the aim of this investigation is verify if polymorphisms of

IL-1A (-889T) and IL-1B (-511T) are involved in the pathogenesis of LOAD in Brazilian patients.

A total of 195 LOAD Brazilian patients with mean age of  $68.7 \pm 8$  years, were selected in accordance with the NINCDS-ADRDA criteria. In order to classify the cognitive impairment, neurological and neuropsychological testing including Mini-Mental State Exam (MMSE) and Clinical Dementia Rating (CDR) were performed. The 188 age-matched controls with mean age  $72.3 \pm 9.75$  were selected according to the MMSE and/or Blessed Scale, socio-cultural and comparable ethnic background. All patients and healthy subjects gave informed consent for participation in this study with approval of ethical committee of Institute of Biosciences, University of São Paulo.

In order to evaluate the distribution of IL polymorphisms in the Brazilian population, genomic DNA was isolated from peripheral blood according to standard procedures [21] and the genotyping was based on previous study [1].

Genotypic and allelic frequencies were compared between LOAD patients and controls using a contingency table and the Fisher's exact test using the program GraphPad Prism Version 3.02. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

The ApoE was strongly associated to AD patients ( $P < 0.0001$ ), however no significant association was observed when we compared either allele or genotype distribution for IL-1A and IL-1B polymorphisms ( $P = 0.813$  and  $P = 0.607$  respectively for allelic and  $P = 0.825$  and  $P = 0.427$  for genotype distribution). Genotype and allelic distributions of ApoE, IL-1A and IL-B are summarized in table 1.

Although recent studies suggest that genetic polymorphism increase the risk for AD [22], only the APOE variants have been proven to be important for AD pathogenesis in worldwide population. In the Brazilian population only this polymorphism has been shown to be strongly associated to LOAD.

Herein we report a lack of association between the IL-1A and IL-1B polymorphisms suggesting they might not confer an increased risk for LOAD in the Brazilian population. Further genetic studies are necessary to investigate the genetic basis and factors involved in the development of the

neurodegenerative process of Alzheimer disease.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank Constancia Urbani, Antonia Maria de Cerqueira, Dr. Maria Rita Passos-Bueno, Carlos Maranduba, Marcia Nery and Sofia Fertuzinhos for their invaluable help. We are also extremely grateful to the families and patients. This work was supported by: FAPESP-CEPID and CNPq.

Table 1: Distribution of the Apolipoprotein E and Interleukin-1 polymorphisms in LOAD Brazilian patients and healthy controls

Polymorphisms		LOAD patients (%) n=195	Controls (%) n=188	P value
ApoE	22	2 (0.01)	3 (0.02)	0.0001
	23	8 (0.04)	11 (0.05)	
	24	6 (0.03)	2 (0.01)	
	33	92 (0.47)	128 (0.68)	
	34	65 (0.34)	41 (0.22)	
	44	22 (0.11)	3 (0.02)	
	2	18 (0.05)	19 (0.05)	
	3	257 (0.66)	308 (0.82)	
4	115 (0.29)	49 (0.13)	<0.0001	
IL-1alpha (-889 C>T)	CC	99 (0.51)	91 (0.48)	0.82
	CT	78 (0.40)	81 (0.43)	
	TT	18 (0.09)	16 (0.09)	
	C	276 (0.70)	263 (0.70)	0.81
	T	114 (0.30)	113 (0.30)	
IL-1 beta (-511 C>T)	CC	72 (0.37)	68 (0.36)	0.42
	CT	83 (0.42)	90 (0.48)	
	TT	40 (0.21)	30 (0.16)	
	C	227 (0.58)	226 (0.60)	0.60
	T	163 (0.42)	150 (0.40)	

## References

- 1 Katila, H., Hanninen, K. and Hurme, M., Polymorphisms of the interleukin-1 gene complex in schizophrenia, *Mol Psychiatry*, 4 (1999) 179-81.

- 2 Nicklin, M.J., Barton, J.L., Nguyen, M., FitzGerald, M.G., Duff, G.W. and Kornman, K., A sequence-based map of the nine genes of the human interleukin-1 cluster, *Genomics*, 79 (2002) 718-25.
- 3 Fertuzinhos, S.M., Oliveira, J.R., Nishimura, A.L., Pontual, D., Carvalho, D.R., Sougey, E.B., Otto, P.A. and Zatz, M., Analysis of IL-1alpha, IL-1beta, and IL-1RA [correction of IL-RA] polymorphisms in dysthymia, *J Mol Neurosci*, 22 (2004) 251-6.
- 4 Meisenzahl, E.M., Rujescu, D., Kirner, A., Giegling, I., Kathmann, N., Leinsinger, G., Maag, K., Hegerl, U., Hahn, K. and Moller, H.J., Association of an interleukin-1beta genetic polymorphism with altered brain structure in patients with schizophrenia, *Am J Psychiatry*, 158 (2001) 1316-9.
- 5 Mattila, K.M., Rinne, J.O., Lehtimäki, T., Roytta, M., Ahonen, J.P. and Hurme, M., Association of an interleukin 1B gene polymorphism (-511) with Parkinson's disease in Finnish patients, *J Med Genet*, 39 (2002) 400-2.
- 6 Du, Y., Dodel, R.C., Eastwood, B.J., Bales, K.R., Gao, F., Lohmuller, F., Muller, U., Kurz, A., Zimmer, R., Evans, R.M., Hake, A., Gasser, T., Oertel, W.H., Griffin, W.S., Paul, S.M. and Farlow, M.R., Association of an interleukin 1 alpha polymorphism with Alzheimer's disease, *Neurology*, 55 (2000) 480-3.
- 7 Grimaldi, L.M., Casadei, V.M., Ferri, C., Veglia, F., Licastro, F., Annoni, G., Biunno, I., De Bellis, G., Sorbi, S., Mariani, C., Canal, N., Griffin, W.S. and Franceschi, M., Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1alpha gene polymorphism, *Ann Neurol*, 47 (2000) 361-5.
- 8 Nicoll, J.A., Mrak, R.E., Graham, D.I., Stewart, J., Wilcock, G., MacGowan, S., Esiri, M.M., Murray, L.S., Dewar, D., Love, S., Moss, T. and Griffin, W.S., Association of interleukin-1 gene polymorphisms with Alzheimer's disease, *Ann Neurol*, 47 (2000) 365-8.
- 9 Ki, C.S., Na, D.L., Kim, D.K., Kim, H.J. and Kim, J.W., Lack of association of the interleukin-1alpha gene polymorphism with Alzheimer's disease in a Korean population, *Ann Neurol*, 49 (2001) 817-8.
- 10 Combarros, O., Sanchez-Guerra, M., Infante, J., Llorca, J. and Berciano, J., Gene dose-dependent association of interleukin-1A [-889] allele 2 polymorphism with Alzheimer's disease, *J Neurol*, 249 (2002) 1242-5.
- 11 Fidani, L., Goulas, A., Mirtsou, V., Petersen, R.C., Tangalos, E., Crook, R. and Hardy, J., Interleukin-1A polymorphism is not associated with late onset Alzheimer's disease, *Neurosci Lett*, 323 (2002) 81-3.
- 12 Green, E.K., Harris, J.M., Lemmon, H., Lambert, J.C., Chartier-Harlin, M.C., St Clair, D., Mann, D.M., Iwatsubo, T. and Lendon, C.L., Are interleukin-1 gene polymorphisms risk factors or disease modifiers in AD? *Neurology*, 58 (2002) 1566-8.
- 13 Hedley, R., Hallmayer, J., Groth, D.M., Brooks, W.S., Gandy, S.E. and Martins, R.N., Association of interleukin-1 polymorphisms with Alzheimer's disease in Australia, *Ann Neurol*, 51 (2002) 795-7.
- 14 Ehl, C., Kolsch, H., Ptok, U., Jessen, F., Schmitz, S., Frahnert, C., Schlosser, R., Rao, M.L., Maier, W. and Heun, R., Association of an

- interleukin-1beta gene polymorphism at position -511 with Alzheimer's disease, *Int J Mol Med*, 11 (2003) 235-8.
- 15 Kuo, Y.M., Liao, P.C., Lin, C., Wu, C.W., Huang, H.M., Lin, C.C. and Chuo, L.J., Lack of association between interleukin-1alpha polymorphism and Alzheimer disease or vascular dementia, *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 17 (2003) 94-7.
- 16 Tsai, S.J., Liu, H.C., Liu, T.Y., Wang, K.Y. and Hong, C.J., Lack of association between the interleukin-1alpha gene C(-889)T polymorphism and Alzheimer's disease in a Chinese population, *Neurosci Lett*, 343 (2003) 93-6.
- 17 Li, X.Q., Zhang, J.W., Zhang, Z.X., Chen, D. and Qu, Q.M., Interleukin-1 gene cluster polymorphisms and risk of Alzheimer's disease in Chinese Han population, *J Neural Transm*, 111 (2004) 1183-90.
- 18 McCulley, M.C., Day, I.N. and Holmes, C., Association between interleukin 1-beta promoter (-511) polymorphism and depressive symptoms in Alzheimer's disease, *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 124 (2004) 50-3.
- 19 Seripa, D., Matera, M.G., Dal Forno, G., Gravina, C., Masullo, C., Daniele, A., Binetti, G., Bonvicini, C., Squitti, R., Palermo, M.T., Davis, D.G., Antuono, P., Wekstein, D.R., Dobrina, A., Gennarelli, M. and Fazio, V.M., Genotypes and haplotypes in the IL-1 gene cluster: analysis of two genetically and diagnostically distinct groups of Alzheimer patients, *Neurobiol Aging*, 26 (2005) 455-64.
- 20 Griffin, W.S., Nicoll, J.A., Grimaldi, L.M., Sheng, J.G. and Mrak, R.E., The pervasiveness of interleukin-1 in alzheimer pathogenesis: a role for specific polymorphisms in disease risk, *Exp Gerontol*, 35 (2000) 481-7.
- 21 Miller, S.A., Dykes, D.D. and Polesky, H.F., A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acids Res*, 16 (1988) 1215.
- 22 Kamboh, M.I., Molecular genetics of late-onset Alzheimer's disease, *Ann Hum Genet*, 68 (2004) 381-404.

## Capítulo 11

---

**Discussão e Conclusão**

Estima-se que aproximadamente 2-3% das doenças são de origem genética, que podem ser divididas em: doença monogênica ou mendeliana, multifatorial ou poligênica, cromossômica e mitocondrial.

Durante o desenvolvimento deste projeto, duas doenças, com dois modelos de herança foram escolhidas com estratégias distintas de estudo: uma doença mendeliana com envolvimento de um gene principal até então desconhecido (Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) familiar – posteriormente denominada ELA tipo 8) e uma doença complexa multifatorial (Doença de Alzheimer (DA) forma tardia) com ênfase em estudo caso-controle.

As duas doenças apresentam algumas características em comum, como por exemplo, formas isoladas e familiares, início precoce ou tardio, a ação de radicais livres e acúmulo protéico intracelular. Além disso, alguns genes estão envolvidos nas duas doenças como, por exemplo, o *ApoE* e genes que codificam proteínas de transporte intracelular.

### 11.1 Esclerose lateral amiotrófica tipo 8

A esclerose lateral amiotrófica tipo 8 é uma doença autossômica dominante do tipo familiar.

Os primeiros relatos históricos dessa família datam da década de 60, quando Finkel (1962) (*apud* Richieri-Costa *et al.*, 1981) relatou uma nova “forma pseudomiopática tardia da atrofia muscular progressiva heredo-familiar”. Posteriormente essa patologia foi estudada por Pern (1978) (*apud* Richieri-Costa *et al.*, 1981) que a considerou como uma forma de atrofia muscular espinhal autossômica dominante. Richieri-Costa *et al.*, 1981 estudaram a família reportada inicialmente por Finkel, além de outra irmandade de origem negra, residente na mesma região e denominaram essa patologia de “atrofia muscular espinhal autossômico dominante adulto, do tipo Finkel” (MIM [182980](#)).

Ao longo dos anos muitos pacientes foram encaminhados a vários neurologistas com diferentes diagnósticos.

Os dados históricos relatam que o primeiro paciente com essa forma de doença do neurônio motor é de origem portuguesa e morou na região da Zona da Mata (Minas Gerais) há pelo menos oito gerações (~160 anos).

Relatos de familiares contam que a família era influente na região e possuía algumas fazendas e muitos escravos. Atualmente grande parte desta família reside na cidade de Guarani e arredores (figura 5). Ainda de acordo com a família há relatos de indivíduos que se mudaram para o Espírito Santo e Rio de Janeiro (consideradas nesse trabalho como família 1).

Uma outra irmandade também residente em Guarani foi descrita por Richieri-Costa *et al.*, 1981 e foi nomeada neste estudo como família 2.

No final da década de 90, pacientes residentes do Rio de Janeiro procuraram o Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH) com uma forma rara de doença do neurônio motor do tipo tardio com características de atrofia muscular espinhal e esclerose lateral amiotrófica. Esta irmandade (família 3) não apresentava familiares diretos provenientes de Guarani e arredores, entretanto o quadro clínico era semelhante ao reportado por Richieri-Costa *et al.*

Nessa mesma época outros pacientes encaminhados pela médica neurologista Dra. Helga C. A. Silva, com quadro clínico semelhante foram encaminhados ao CEGH e após a entrevista verificou-se pertencerem à família 3. As pacientes reportaram que a família original residia em Mutum (MG) e em cidades próximas a capital mineira.

A avaliação clínica e neurológica realizada em colaboração com a Dra. Helga Silva foi feita em visita domiciliar a pacientes de Belo Horizonte, Mutum e Ouro Preto no final de 2002.

Com base nos dados da família 3, foi realizado um estudo de ligação e o loco foi mapeado em 20q13.3 (Capítulo 3).

Uma nova coleta foi realizada na cidade de Guarani no início de 2003 juntamente com o Dr. Fernando Kok e verificou-se que as famílias 1 e 2 também apresentavam ligação com os marcadores do cromossomo 20.

Após estudarmos alguns genes localizados nessa região, foi possível identificar a mutação P56S no gene *VAP-B* como o responsável por essa patologia nessas famílias (Capítulo 4).

Novas famílias foram encaminhadas ao CEGH e a mutação no gene *VAP-B* foi confirmada. Em entrevista, os pacientes reportaram terem descendência portuguesa com familiares residentes em Minas Gerais. No

total 8 famílias foram incluídas nessa tese. Embora não tenha sido possível achar um elo de consangüinidade com a família 1, um estudo recente indica um efeito fundador para essa mutação.

Observou-se que essas famílias apresentam um haplótipo comum e por meio de testes estatísticos verificou-se que a mutação provavelmente ocorreu há aproximadamente 400-500 anos, consistente com a colonização portuguesa no Brasil (Capítulo 5). Esse achado tem duas possíveis explicações: a mutação ocorreu no Brasil e dispersou-se somente no nosso país ou a mutação ocorreu em Portugal e foi trazida ao Brasil com a colonização portuguesa. No momento diferentes grupos estão estudando o gene *VAP-B* em pacientes portugueses com doença do neurônio motor. Entretanto até a finalização deste capítulo nenhuma mutação foi aparentemente encontrada.

Dado que a família 3 foi a estudada quando o novo gene foi mapeado e a grande maioria dos pacientes apresenta características de uma forma atípica de ELA, esta forma de doença do neurônio motor foi renomeada pelo *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) como uma forma familiar de esclerose lateral amiotrófica do tipo 8 (ELA8, MIM [608627](#)).

Em 2005 foi realizada uma nova visita a cidade de Guarani com a presença do Dr. Fernando Kok para uma re-avaliação clínica-neurológica dos pacientes daquela localidade. Esses exames sugerem que a atrofia espinhal do tipo Finkel na realidade é uma variação da ELA8. Por se tratar de uma doença exclusivamente brasileira, novos testes e estudos clínicos devem ser realizados a fim de se esclarecer essa confusão de nomenclatura. Independentemente do nome da doença, a mutação no gene foi encontrada em todos os pacientes analisados. Alguns pacientes apresentaram uma evolução mais rápida, típica de ELA, entretanto a grande maioria apresenta um quadro mais lento com sobrevida de 10-20 anos. Não é possível saber se os pacientes com evolução rápida apresentaram esse quadro por causa de genes modificadores, fatores epigenéticos ou ambientais. De qualquer modo, a procura de genes modificadores será de grande interesse.

Marques *et al.*, 2004 estudaram alguns membros da família 1 e verificaram ligação na mesma região reportada pelo nosso grupo. Entretanto

este grupo considerou essa patologia como uma “forma hereditária de neuropatia motora e autonômica”. Os autores reportam que uma das características dessa doença seria o aumento anormal de suor e disfunção gastrointestinal e sexual. Além disso, os autores reportam que a dislipidemia seria um fator importante dessa patologia.

Avaliando as 8 famílias com mutação confirmada no gene *VAP-B*, verificamos que nem todos os pacientes apresentam alterações nos níveis de colesterol ou lípides em geral. Dado que essas 8 famílias apresentam aproximadamente 1500 indivíduos dos quais quase 200 apresentam a mutação no gene *VAP-B* não se pode excluir a possibilidade de que outras doenças, presentes em algumas irmandades, possam de alguma forma mascarar os sinais e sintomas da ELA8. Observamos que muitos membros da família 1 (incluindo pacientes e indivíduos normais) apresentam problemas cardiovasculares e diabetes, que são doenças comuns no mundo inteiro. Além disso, pacientes dessa família apresentam também uma perda de sensibilidade nas extremidades e, portanto essa doença poderia ser facilmente confundida com uma neuropatia periférica. Concluímos, portanto que a ELA8 apresenta um amplo espectro com sintomatologia de atrofia espinhal progressiva, esclerose lateral amiotrófica e mesmo neuropatia periférica. Observamos que dependendo da fase da doença alguns sintomas se manifestem mais que outros e sugerimos que uma caracterização clínica-neurológica minuciosa seja realizada.

Na tentativa de se divulgar e caracterizar a ELA8 no Brasil, uma carta de esclarecimento foi escrita pelo Dr. Fernando Kok baseadas nas observações clínicas do maior número possível de pacientes com a mutação no gene *VAP-B*. O exame de DNA poderá permitir um diagnóstico imediato, dispensando a realização de exames invasivos como a eletroneuromiografia ou biópsia muscular.

De acordo com o documento redigido pelo Dr. Kok (anexo) a ELA8 pode ser dividida em três fases:

1. Fase prodrômica, que ocorre meses ou poucos anos antes da instalação da fraqueza muscular.

Caracteriza-se por câibras nos membros e na musculatura dorsal e abdominal, fasciculações que afetam de forma indistinta qualquer músculo esquelético, exceto os da face e dor na região da coluna vertebral, que se irradia da região da nuca para o dorso.

#### 2. Fase sintomática inicial (duração: 2 - 5 anos)

Caracteriza-se por fraqueza muscular de predomínio PROXIMAL, de início em membros inferiores, levando a dificuldade progressiva para caminhar. Posteriormente, há também comprometimento de musculatura proximal de membros superiores, que pode ser assimétrico; quando isso ocorre, o membro superior dominante costuma ser mais intensamente afetado. Os reflexos miotáticos podem se mostrar desproporcionalmente vivos/exaltados, mas com o progredir da doença, vão se extinguindo. O cutâneo plantar pode se achar em extensão (sinal de Babinski) ou ser indiferente. O cutâneo abdominal em geral acha-se abolido. As fasciculações e câibras estão presentes, mas de forma menos intensa que na fase prodrômica. Pode-se notar amiotrofias na cintura pélvica e escapular e observa-se tremor de atitude das mãos, que é assíncrono, arritmico e que se dá de forma alternada nos dedos (polimioclonia). Com freqüência, ocorrem engasgos. Observa-se ainda significativo aumento da circunferência abdominal, possivelmente secundária a fraqueza de sua musculatura e raramente encontram-se alterações da sensibilidade (Figura 20a do capítulo 13).

#### 3. Fase sintomática avançada (duração: 2 - 20 anos)

A perda da marcha independente marca o início dessa fase. O déficit motor permanece mais intenso em musculatura proximal, e a progressão da fraqueza de membros inferiores pode dificultar ou impedir o braço acima do plano dos ombros (Figura 20a do capítulo 13). A musculatura das mãos e dos pés é afetada apenas tardiamente na evolução da doença; a musculatura facial parece ser poupada e a cervical atingida tardiamente. A língua pode ter fasciculações e amiotrofia e a motricidade ocular é normal. Em alguns pacientes, observa-se ainda diminuição da sensibilidade tátil e dolorosa com padrão de “bota” ou, mais raramente, “luva”, e redução da sensibilidade vibratória em membros inferiores. Outros sinais de neuropatia

periférica, como pés cavos (Figura 20b do capítulo 13), hipotermia e alteração da perfusão periférica podem estar presentes. Podem ocorrer dificuldades respiratórias e alguns pacientes necessitam de assistência ventilatória e traqueostomia.

A análise de biópsia muscular revela um padrão neurogênico (Figura 19 do capítulo 13) e os exames de creatino-quinase está levemente alterado no início da doença tornando-se normal no decorrer dos anos.

Uma vez identificado o gene e o seu produto a questão seguinte é:

#### **Qual é a função da proteína VAP-B?**

A VAP-B é uma proteína transmembrana que está localizada na membrana do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi. Acredita-se que esteja envolvida no transporte intracelular.

Ela foi descrita inicialmente por Nishimura *et al.*, 1999, com homologia a VAP-A localizada no cromossomo 18. As VAP's são proteínas conservadas e podem ser observadas em leveduras, plantas, moscas, roedores e humanos. De modo geral elas estão envolvidas no transporte de vesículas, mas sua localização na célula pode variar. Por exemplo, nas drosófilas elas estão localizadas nas placas sinápticas enquanto que em humanos e camundongos estão localizadas em organelas envolvidas com transporte vesicular.

A mutação P56S foi inserida em diferentes tipos celulares (células HEK293 e neurônios de camundongos) e verificou-se que a super-expressão da proteína mutante forma agregados celulares que não estão localizados no retículo endoplasmático nem no complexo de golgi. Essas inclusões protéicas poderiam causar um acúmulo intracelular impedindo o bom funcionamento do tráfego axonal e causando conseqüentemente a morte do neurônio motor (Figura 18 do capítulo 13).

Em estudos recentes verificou-se que a VAP-B interage com diferentes proteínas como a *Nir-1*, *Nir-2* e *Nir-3* (Amarillo *et al.*, 2005). Estas proteínas estão associadas com o metabolismo de colesterol e lípidos. Os autores reportam que a VAP-B além de atuar no transporte intracelular apresentaria um papel importante na estrutura do retículo endoplasmático. Sugerem ainda

que a VAP-B interage com as proteínas Nir por meio do domínio *FFAT* (duas fenilalaninas (FF) e um trato ácido – *acidic tract*).

Loewen *et al.*, 2005, estudaram a proteína de levedura homóloga a VAP-B, SCS2 e observaram novamente a interação do motivo FFAT com as VAP's. Os autores induziram uma série de mutações ao longo do gene e observaram resíduos críticos, que quando ausentes interferem na interação entre estas proteínas.

Curiosamente os autores identificaram uma mutação no gene de levedura SCS2 (P51S), correspondente a P56S observada em pacientes brasileiros e verificaram que essa mutação não altera sua interação com o domínio FFAT. Os autores sugerem que essa mutação, embora altere a estrutura da proteína, mantém a sua capacidade, talvez parcial, de interagir com outras proteínas e recrutar outras proteínas com o motivo FFAT.

Hamamoto *et al.*, 2005 estudando a proteína não-estrutural (NS5A) do vírus da hepatite C (*HCV – hepatitis C virus*) verificaram por meio da técnica de duplo-híbrido que a proteína VAP-B interage com ela e com a NS5B. A NS5A e NS5B são fosfoproteínas que interagem com várias proteínas celulares e participam da replicação do HCV.

Este grupo verificou que a NS5A está localizada na membrana do retículo endoplasmático e do complexo de golgi. Além disso, verificaram que a super-expressão da VAP-B aumenta a expressão da NS5A e NS5B e conseqüentemente a replicação do HCV em células Huh-7.

Por meio do RNA de interferência verificaram que a inibição da VAP-B inibe também a NS5B, sugerindo mais uma vez a interação dessas proteínas e sua importância na replicação do vírus da hepatite C.

Novos estudos devem ser realizados na tentativa de entendermos como uma mutação no gene *VAP-B* causa esta intrigante patologia da ELA8.

Até o momento não há indícios de que a ELA8 ocorra em outros países além do Brasil. Ainda não é sabido se a dislipidemia presente em alguns pacientes possa ter alguma relação com a VAP-B e proteínas associadas, nem se a diabetes poderia ser um fator modulador do quadro clínico em outros pacientes.

Acreditamos que uma das formas de se tratar a ELA8 seria tentar impedir ou bloquear a formação precoce dos agregados celulares. Uma das possíveis formas de se evitar o acúmulo protéico seria por meio de RNA de interferência inibir a ação da VAP-B. Os nossos resultados iniciais demonstraram que é possível inativar a proteína VAP-B em modelos celulares. Entretanto novos experimentos serão realizados para verificarmos se é possível bloquear a proteína sem alterar o funcionamento celular. Isso porque sabemos hoje que a VAP-B interage com diferentes proteínas importantes não somente no transporte intracelular como também na estrutura de organelas.

## 11.2 Doença de Alzheimer não familiar

A Doença de Alzheimer (DA), uma das doenças mais comuns em idosos, é o segundo tema dessa tese. Aproximadamente 90-95% dos casos são de casos isolados com padrão de herança multifatorial.

Após a identificação da variante ApoE- $\epsilon$ 4 como fator de predisposição diferentes grupos têm buscado identificar novos polimorfismos envolvidos na DA nos últimos anos. Entretanto, até o momento não foi identificado nenhum outro gene com uma função tão importante quanto o *ApoE*.

Na população brasileira, o alelo ApoE- $\epsilon$ 4 também está presente em maior frequência no grupo de pacientes com DA comparado com o grupo controle (Oliveira *et al.*, 1997; de-Andrade *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2003).

Zubenko *et al.*, 1998 identificaram associação positiva nos marcadores DXS1047 e D10S1423, que também foram estudados em pacientes brasileiros com DA. Entretanto na amostra brasileira nenhuma associação foi observada (Nishimura *et al.*, 2000, 2001).

Além destes marcadores, polimorfismos nos genes do transportador de serotonina (*5HTTLPR*), fator neurotrófico derivado do cérebro (*BDNF*), monoamino oxidase A (*MAOA*) e as interleucinas 1 alfa e beta (*IL-1A* e *IL-1B*) também foram estudados nos pacientes brasileiros com Doença de Alzheimer (Oliveira *et al.*, 1998, Nishimura *et al.*, 2004, 2005).

Uma inserção/deleção de 44pb localizado no promotor do gene transportador da serotonina (*5HTTLPR*) parece estar relacionada a uma

maior susceptibilidade em desenvolver DA em diferentes populações. Oliveira *et al.*, 1998 estudaram inicialmente 81 pacientes com DA e 82 controles normais. Observou-se que a frequência da variante curta é maior no grupo de pacientes com DA do que os controles normais ( $P < 0,05$ ). Posteriormente, foram estudados 128 pacientes com DA e 126 controles normais e observou-se associação somente na distribuição genotípica ( $P = 0,05$ ) Nishimura *et al.*, 2005. Entretanto, em uma amostra maior de pacientes (192) e controles (151) observou-se ausência de associação na distribuição genotípica ( $P = 0,06$ ) e alélica ( $P = 0,58$ ). Estes dados não foram incluídos na tese, mas reforçam a necessidade de se estudar muitos pacientes para se verificar a importância de um polimorfismo em uma determinada população.

O segundo polimorfismo estudado nessa amostra de pacientes brasileiros com Doença de Alzheimer foi uma alteração de um único nucleotídeo presente no promotor do gene *BDNF* (*brain derived-neurotrophic factor*) – (C-270T).

Kunugi *et al.*, 2001 observaram que a variante T confere um aumento de susceptibilidade de desenvolver a DA na população japonesa.

Diferentes grupos estudaram este polimorfismo e outros localizados na região codificadora do gene. Os resultados podem ser visualizados na meta-análise organizada por Bertram *et al.* (<http://www.alzforum.org/res/com/gen/alzgene/geneoverview.asp?geneid=109>).

De maneira geral os resultados são controversos e observa-se que dependendo da população o polimorfismo pode estar associado ou não a doença de Alzheimer.

De acordo com a meta-análise, o alelo 270T é uma variante de risco para a população japonesa (Kunugi *et al.*, 2001 e Nishimura *et al.*, 2005), enquanto que em caucasianos esse polimorfismo pode ou não estar associado a DA (Olin *et al.*, 2005, [Riemenschneider, 2002](#), Bodner *et al.*, 2005, Desai *et al.*, 2005).

Na amostra brasileira, foram incluídos neste estudo 188 pacientes com DA e 188 indivíduos controles e observamos que o alelo T não confere um aumento no risco de se desenvolver esta doença.

Outro polimorfismo estudado nesta amostra de pacientes brasileiros foi uma variante localizada na região promotora do gene da Monoamino Oxidase A (MAOA).

A proteína MAOA é uma enzima, localizada na mitocôndria, que catalisa a degradação oxidativa de aminas biogênicas, incluindo neurotransmissores como a nor-adrenalina, dopamina e serotonina.

Inibidores de MAOA são usados para tratamento dos sintomas de depressão e pressão alta.

Sabol *et al.*, 1998, identificaram um polimorfismo constituído de uma seqüência de repetições de 30pb na região promotora do gene (Sabol *et al.*, 1998). Este grupo verificou que os alelos com 3.5 ou 4 cópias da seqüência repetitiva são transcritas de 2 a 10 vezes mais eficientemente que aquelas com 3 ou 5 cópias de repetição (Sabol *et al.*, 1998). Isto é, os alelos com 3.5 ou 4 repetições estariam atuando mais efetivamente na degradação de seus substratos, diminuindo a concentração de serotonina. É sabido que a diminuição dos níveis de serotonina pode causar desvios de comportamento (agressividade) e dessa forma poderia estar relacionada com a DA.

Em vista disso foram estudados 128 pacientes brasileiros com DA e 126 controles normais (Nishimura *et al.*, 2005).

Nenhuma alteração na distribuição alélica foi identificada quando os sexos foram analisados separadamente ( $P=0,1$  para os homens e  $P=0,27$  para mulheres). Entretanto observou-se associação significativa quando os sexos foram analisados juntos ( $P=0,01$ ). Neste estudo, verificamos que o alelo curto do 5HTTLPR e o alelo 1 da MAOA estavam presentes em 19 pacientes e em somente 4 controles ( $P=0,001$ ).

Uma possível explicação deste achado seria que a combinação de diferentes genes poderia estar atuando na patogênese da DA. Entretanto não se pode excluir a possibilidade de que tenha ocorrido ao acaso.

Takehashi *et al.*, 2002 estudando um outro polimorfismo no gene da MAOA encontraram uma associação positiva, sugerindo que este gene poderia estar envolvido na patologia da Doença de Alzheimer.

Finalmente, os últimos polimorfismos estudados nesta amostra de pacientes estão localizados nos genes *Interleucina 1 alfa (IL-1A)* e *Interleucina 1 beta (IL-1B)*.

A função destes polimorfismos ainda é desconhecida, entretanto acredita-se que a tradução e o processamento da proteína precursora beta-amilóide pode ser induzida por estas variantes, com possíveis implicações na formação das placas amilóides (Griffin *et al.*, 2000).

Neste último trabalho, foram estudados 195 pacientes brasileiros com DA e 188 controles normais.

Apesar de encontrarmos uma associação entre o alelo  $\epsilon 4$  da ApoE e o grupo de pacientes ( $P < 0,0001$ ) não foi possível encontrar associação entre os polimorfismos localizados na IL-1A e IL-1B ( $P = 0,813$  e  $P = 0,607$  respectivamente para a distribuição alélica e  $P = 0,825$  e  $P = 0,427$  para a distribuição genotípica) e o grupo de pacientes com DA.

De modo geral chegamos à conclusão de que nesta amostra da população brasileira o único polimorfismo estudado que apresenta implicações na patologia de Alzheimer é o polimorfismo da ApoE.

Atualmente, com as novas tecnologias é possível identificar polimorfismos mais facilmente. Tentar entender a verdadeira função dessas alterações na patogênese da Doença de Alzheimer será o grande desafio para o futuro.

Até o momento a Doença de Alzheimer não tem cura. Entretanto é possível tratar os sintomas como depressão, agressividade e retardar o avanço progressivo da doença. Diferentes medicamentos estão disponíveis para o tratamento dos sintomas e atualmente discute-se o uso de vacina para a DA.

Sabe-se que as placas amilóides são importantes para a patologia da doença de Alzheimer e estudos em animais sugerem que o uso de vacinas pode retardar o aparecimento destas placas de maneira eficiente.

A vacina causa uma resposta imune e poderia evitar a formação e desenvolvimento das placas e a deterioração das células nervosas.

Em resumo, estas duas doenças neurológicas com modelos de herança e mecanismos semelhantes foram os temas deste trabalho.

Na primeira parte da tese deu-se ênfase na forma familiar de esclerose lateral amiotrófica, com a identificação de uma nova doença autossômica dominante tardia, seleção das famílias, mapeamento de um novo loco, identificação do gene, efeito fundador e possível inativação da proteína por meio de RNA de interferência como forma de tratamento. Na segunda parte da tese foram realizados estudos de associação na forma esporádica

(isolada) da doença de Alzheimer com possíveis genes de susceptibilidade envolvidos em diferentes vias. Entender os mecanismos que causam a forma esporádica da DA é um grande desafio para qualquer pesquisador e é necessário analisar um grande número de pacientes para se chegar a alguma conclusão. Por exemplo, verificamos que na nossa população o polimorfismo do 5HTTLPR estava associado no primeiro estudo, entretanto quando a amostra foi aumentada esse achado não foi confirmado.

Outro fato importante é selecionar um grupo controle adequado para o estudo de associação. Principalmente em uma população miscigenada como a população brasileira.

De maneira geral tanto a ELA quanto a DA são doenças de grande impacto na população mundial. Apesar dos estudos realizados até o momento, o mecanismo patológico de ambas ainda não é conhecido.

Além disso, como são doenças genéticas de início tardio, muitas questões éticas são levantadas tais como: o aconselhamento genético em familiares com um único indivíduo afetado pela doença; testes em indivíduos assintomáticos, diagnóstico pré-implantação, tratamentos sabidamente ineficazes e enfim possíveis terapias com o uso de células-tronco.

Esperamos que no futuro possamos compreender um pouco mais destas patologias e contribuir para o tratamento desses pacientes.

## Capítulo 12

---

### Referências

**Referências bibliográficas**

Abalkhail, H., J. Mitchell, *et al.* A new familial amyotrophic lateral sclerosis locus on chromosome 16q12.1-16q12.2. Am J Hum Genet, v.73, n.2, Aug, p.383-9. 2003.

Ait-Ghezala, G., L. Abdullah, *et al.* Confirmation of association between D10S583 and Alzheimer's disease in a case--control sample. Neurosci Lett, v.325, n.2, Jun 7, p.87-90. 2002.

Al-Chalabi, A., M. D. Scheffler, *et al.* Ciliary neurotrophic factor genotype does not influence clinical phenotype in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol, v.54, n.1, Jul, p.130-4. 2003.

Al-Chalabi, A., P. M. Andersen, *et al.* Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. Hum Mol Genet, v.8, n.2, Feb, p.157-64. 1999.

Al-Chalabi, A., P. M. Andersen, *et al.* Recessive amyotrophic lateral sclerosis families with the D90A SOD1 mutation share a common founder: evidence for a linked protective factor. Hum Mol Genet, v.7, n.13, Dec, p.2045-50. 1998.

Alvarez, V., I. F. Mata, *et al.* Association between the TNFalpha-308 A/G polymorphism and the onset-age of Alzheimer disease. Am J Med Genet, v.114, n.5, Jul 8, p.574-7. 2002.

Amarilio, R., S. Ramachandran, *et al.* Differential regulation of endoplasmic reticulum structure through VAP-Nir protein interaction. J Biol Chem, v.280, n.7, Feb 18, p.5934-44. 2005.

Amtul, Z., P. A. Lewis, *et al.* A presenilin 1 mutation associated with familial frontotemporal dementia inhibits gamma-secretase cleavage of APP and notch. Neurobiol Dis, v.9, n.2, Mar, p.269-73. 2002.

Azzouz, M., G. S. Ralph, *et al.* VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. Nature, v.429, n.6990, May 27, p.413-7. 2004.

Bagnoli, S., A. Tedde, *et al.* The urokinase-plasminogen activator (PLAU) gene is not associated with late onset Alzheimer's disease. Neurogenetics, v.6, n.1, Feb, p.53-4. 2005.

Beaulieu, J. M., M. D. Nguyen, *et al.* Late onset of motor neurons in mice overexpressing wild-type peripherin. J Cell Biol, v.147, n.3, Nov 1, p.531-44. 1999.

Bekkers, J. M. e C. F. Stevens. NMDA and non-NMDA receptors are co-localized at individual excitatory synapses in cultured rat hippocampus. Nature, v.341, n.6239, Sep 21, p.230-3. 1989.

*Bertram L, McQueen M, Mullin K, Blacker D, Tanzi R. The AlzGene Database. Alzheimer Research Forum. Available at: <http://www.alzgene.org>*

Bertram, L., M. Hiltunen, *et al.* Family-based association between Alzheimer's disease and variants in UBQLN1. N Engl J Med, v.352, n.9, Mar 3, p.884-94. 2005.

Bertram, L. e R. E. Tanzi. Dancing in the dark? The status of late-onset Alzheimer's disease genetics. J Mol Neurosci, v.17, n.2, Oct, p.127-36. 2001.

Bertram, L., D. Blacker, *et al.* Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. Science, v.290, n.5500, Dec 22, p.2302-3. 2000.

Bian, L., J. D. Yang, *et al.* Insulin-degrading enzyme and Alzheimer disease: a genetic association study in the Han Chinese. Neurology, v.63, n.2, Jul 27, p.241-5. 2004.

Blair, I. P., C. L. Bennett, *et al.* A gene for autosomal dominant juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4) localizes to a 500-kb interval on chromosome 9q34. Neurogenetics, v.3, n.1, Sep, p.1-6. 2000.

Bodner, S. M., W. Berrettini, *et al.* Genetic variation in the brain derived neurotrophic factor gene in Alzheimer's disease. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, v.134, n.1, Apr 5, p.1-5. 2005.

Bongioanni, P., C. Reali, *et al.* Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. Cochrane Database Syst Rev, n.3, p.CD004302. 2004.

Boussaha, M., D. Hannequin, *et al.* Polymorphisms of insulin degrading enzyme gene are not associated with Alzheimer's disease. Neurosci Lett, v.329, n.1, Aug 23, p.121-3. 2002.

Brandt, R., M. Hundelt, *et al.* Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models. Biochim Biophys Acta, v.1739, n.2-3, Jan 3, p.331-54. 2005.

Brooks, Br., R.G. Miller, *et al.* Swash M, Munsat TL, for the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. ALS 2000; 2 (suppl.2): S293-S298.

Bruijn, L. I., M. K. Houseweart, *et al.* Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. Science, v.281, n.5384, Sep 18, p.1851-4. 1998.

Bullido, M. J., P. Guallar-Castillon, *et al.* Alzheimer's risk associated with human apolipoprotein E, alpha-2 macroglobulin and lipoprotein receptor related protein polymorphisms: absence of genetic interactions, and modulation by gender. Neurosci Lett, v.289, n.3, Aug 11, p.213-6. 2000.

Bullock, T. L., T. M. Roberts, *et al.* 2.5 A resolution crystal structure of the motile major sperm protein (MSP) of *Ascaris suum*. J Mol Biol, v.263, n.2, Oct 25, p.284-96. 1996.

Chance, P. F., B. A. Rabin, *et al.* Linkage of the gene for an autosomal dominant form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 9q34. Am J Hum Genet, v.62, n.3, Mar, p.633-40. 1998.

Chen, Y. Z., C. L. Bennett, *et al.* DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). Am J Hum Genet, v.74, n.6, Jun, p.1128-35. 2004.

Chesneau, V., K. Vekrellis, *et al.* Purified recombinant insulin-degrading enzyme degrades amyloid beta-protein but does not promote its oligomerization. Biochem J, v.351 Pt 2, Oct 15, p.509-16. 2000.

Collard, J. F., F. Cote, *et al.* Defective axonal transport in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Nature, v.375, n.6526, May 4, p.61-4. 1995.

Collier, D. A., G. Stober, *et al.* A novel functional polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene: possible role in susceptibility to affective disorders. Mol Psychiatry, v.1, n.6, Dec, p.453-60. 1996.

Combarros, O., M. Sanchez-Guerra, *et al.* Gene dose-dependent association of interleukin-1A [-889] allele 2 polymorphism with Alzheimer's disease. J Neurol, v.249, n.9, Sep, p.1242-5. 2002.

Connor, B., D. Young, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease. Brain Res Mol Brain Res, v.49, n.1-2, Oct 3, p.71-81. 1997.

Corcia, P., J. Khoris, *et al.* SMN1 gene study in three families in which ALS and spinal muscular atrophy co-exist. Neurology, v.59, n.9, Nov 12, p.1464-6. 2002.

Craddock, N. e C. Lendon. New susceptibility gene for Alzheimer's disease on chromosome 12? Lancet, v.352, n.9142, Nov 28, p.1720-1. 1998.

Culpan, D., S. H. Macgowan, *et al.* Tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms and Alzheimer's disease. Neurosci Lett, v.350, n.1, Oct 16, p.61-5. 2003.

De Jonghe, P., M. Auer-Grumbach, *et al.* Autosomal dominant juvenile amyotrophic lateral sclerosis and distal hereditary motor neuronopathy with pyramidal tract signs: synonyms for the same disorder? Brain, v.125, n.Pt 6, Jun, p.1320-5. 2002.

De-Andrade, F. M., M. Larrandaburu, *et al.* Association of apolipoprotein E polymorphism with plasma lipids and Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population. Braz J Med Biol Res, v.33, n.5, May, p.529-37. 2000.

Deckert, J., M. Catalano, *et al.* Excess of high activity monoamine oxidase A gene promoter alleles in female patients with panic disorder. Hum Mol Genet, v.8, n.4, Apr, p.621-4. 1999.

Desai, P., R. Nebes, *et al.* Investigation of the effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) polymorphisms on the risk of late-onset Alzheimer's disease (AD) and quantitative measures of AD progression. Neurosci Lett, v.379, n.3, May 13, p.229-34. 2005.

Devon, R. S., J. R. Helm, *et al.* The first nonsense mutation in alsin results in a homogeneous phenotype of infantile-onset ascending spastic paralysis with bulbar involvement in two siblings. Clin Genet, v.64, n.3, Sep, p.210-5. 2003.

Dietrich-Neto, F., D. Callegaro, *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis in Brazil: 1998 national survey. Arq Neuropsiquiatr, v.58, n.3A, Sep, p.607-15. 2000.

Drory, V. E., M. Birnbaum, *et al.* Association of APOE epsilon4 allele with survival in amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Sci, v.190, n.1-2, Sep 15, p.17-20. 2001.

Du, Y., R. C. Dodel, *et al.* Association of an interleukin 1 alpha polymorphism with Alzheimer's disease. Neurology, v.55, n.4, Aug 22, p.480-3. 2000.

Edland, S. D. Insulin-degrading enzyme, apolipoprotein E, and Alzheimer's disease. J Mol Neurosci, v.23, n.3, p.213-7. 2004.

Edland, S. D., F. Wavrant-De Vriese, *et al.* Insulin degrading enzyme (IDE) genetic variants and risk of Alzheimer's disease: evidence of effect modification by apolipoprotein E (APOE). Neurosci Lett, v.345, n.1, Jul 10, p.21-4. 2003.

Ehl, C., H. Kolsch, *et al.* Association of an interleukin-1beta gene polymorphism at position -511 with Alzheimer's disease. Int J Mol Med, v.11, n.2, Feb, p.235-8. 2003.

Ertekin-Taner, N., N. Graff-Radford, *et al.* Linkage of plasma Abeta42 to a quantitative locus on chromosome 10 in late-onset Alzheimer's disease pedigrees. Science, v.290, n.5500, Dec 22, p.2303-4. 2000.

Eymard-Pierre, E., G. Lesca, *et al.* Infantile-onset ascending hereditary spastic paralysis is associated with mutations in the alsin gene. Am J Hum Genet, v.71, n.3, Sep, p.518-27. 2002.

Farah, C. A., M. D. Nguyen, *et al.* Altered levels and distribution of microtubule-associated proteins before disease onset in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. J Neurochem, v.84, n.1, Jan, p.77-86. 2003.

Farrer, L. A., R. P. Friedland, *et al.* Genetic and environmental epidemiology of Alzheimer's disease in arabs residing in Israel. J Mol Neurosci, v.20, n.3, p.207-12. 2003.

Feuk, L., S. McCarthy, *et al.* Mutation screening of a haplotype block around the insulin degrading enzyme gene and association with Alzheimer's disease. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, v.136, n.1, Jul 5, p.69-71. 2005.

Fertuzinhos, S. M., J. R. Oliveira, *et al.* Analysis of IL-1alpha, IL-1beta, and IL-1RA [correction of IL-RA] polymorphisms in dysthymia. J Mol Neurosci, v.22, n.3, p.251-6. 2004.

Fidani, L., A. Goulas, *et al.* Interleukin-1A polymorphism is not associated with late onset Alzheimer's disease. Neurosci Lett, v.323, n.1, Apr 19, p.81-3. 2002.

Finckh, U., K. Van Hadeln, *et al.* Association of late-onset Alzheimer disease with a genotype of PLAU, the gene encoding urokinase-type plasminogen activator on chromosome 10q22.2. Neurogenetics, v.4, n.4, Aug, p.213-7. 2003.

Finkel, N. A forma pseudomiopatica tardia da atrofia muscular progressiva heredo-familial. Arquiv. Neuropsiquiatr. V.20, p.307-322. 1962.

Foster, L. J., M. L. Weir, *et al.* A functional role for VAP-33 in insulin-stimulated GLUT4 traffic. Traffic, v.1, n.6, Jun, p.512-21. 2000.

Funakoshi, H., M. Risling, *et al.* Targeted expression of a multifunctional chimeric neurotrophin in the lesioned sciatic nerve accelerates regeneration of sensory and motor axons. Proc Natl Acad Sci U S A, v.95, n.9, Apr 28, p.5269-74. 1998.

Furlong, R. A., L. Ho, *et al.* Analysis of the monoamine oxidase A (MAOA) gene in bipolar affective disorder by association studies, meta-analyses, and sequencing of the promoter. Am J Med Genet, v.88, n.4, Aug 20, p.398-406. 1999.

Genin, E., A. Tullio-Pelet, *et al.* Estimating the age of rare disease mutations: the example of Triple-A syndrome. J Med Genet, v.41, n.6, Jun, p.445-9. 2004.

Giess, R., B. Holtmann, *et al.* Early onset of severe familial amyotrophic lateral sclerosis with a SOD-1 mutation: potential impact of CNTF as a candidate modifier gene. Am J Hum Genet, v.70, n.5, May, p.1277-86. 2002.

Gilliam, T. C., L. M. Brzustowicz, *et al.* Genetic homogeneity between acute and chronic forms of spinal muscular atrophy. Nature, v.345, n.6278, Jun 28, p.823-5. 1990.

Graff-Radford, N. R., R. C. Green, *et al.* Association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease in African American subjects. Arch Neurol, v.59, n.4, Apr, p.594-600. 2002.

Green, E. K., J. M. Harris, *et al.* Are interleukin-1 gene polymorphisms risk factors or disease modifiers in AD? Neurology, v.58, n.10, May 28, p.1566-8. 2002.

Greenow, K., N. J. Pearce, *et al.* The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. J Mol Med, v.83, n.5, May, p.329-42. 2005.

Griffin, W. S., J. A. Nicoll, *et al.* The pervasiveness of interleukin-1 in alzheimer pathogenesis: a role for specific polymorphisms in disease risk. Exp Gerontol, v.35, n.4, Jul, p.481-7. 2000.

Grimaldi, L. M., V. M. Casadei, *et al.* Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1alpha gene polymorphism. Ann Neurol, v.47, n.3, Mar, p.361-5. 2000.

Gros-Louis, F., I. A. Meijer, *et al.* An ALS2 gene mutation causes hereditary spastic paraplegia in a Pakistani kindred. Ann Neurol, v.53, n.1, Jan, p.144-5. 2003.

Gros-Louis, F., R. Lariviere, *et al.* A frameshift deletion in peripherin gene associated with amyotrophic lateral sclerosis. J Biol Chem, v.279, n.44, Oct 29, p.45951-6. 2004.

Gutierrez, B., B. Arias, *et al.* Association analysis between a functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter and severe mood disorders. Psychiatr Genet, v.14, n.4, Dec, p.203-8. 2004.

Hadano, S., C. K. Hand, *et al.* A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. Nat Genet, v.29, n.2, Oct, p.166-73. 2001.

Hafezparast, M., R. Klocke, *et al.* Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. Science, v.300, n.5620, May 2, p.808-12. 2003.

Hamamoto, I., Y. Nishimura, *et al.* Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. J Virol, v.79, n.21, Nov, p.13473-82. 2005.

Hand, C. K., J. Khoris, *et al.* A novel locus for familial amyotrophic lateral sclerosis, on chromosome 18q. Am J Hum Genet, v.70, n.1, Jan, p.251-6. 2002.

Hand, C. K. e G. A. Rouleau. Familial amyotrophic lateral sclerosis. Muscle Nerve, v.25, n.2, Feb, p.135-59. 2002.

Hedley, R., J. Hallmayer, *et al.* Association of interleukin-1 polymorphisms with Alzheimer's disease in Australia. Ann Neurol, v.51, n.6, Jun, p.795-7. 2002.

Hentati, A., K. Bejaoui, *et al.* Linkage of recessive familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 2q33-q35. Nat Genet, v.7, n.3, Jul, p.425-8. 1994.

Hentati, A., K. Ouahchi, *et al.* Linkage of a commoner form of recessive amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 15q15-q22 markers. Neurogenetics, v.2, n.1, Dec, p.55-60. 1998.

Hirano, M., W. Y. Hung, *et al.* Multiple transcripts of the human Cu,Zn superoxide dismutase gene. Biochem Biophys Res Commun, v.276, n.1, Sep 16, p.52-6. 2000.

Hosler, B. A., T. Siddique, *et al.* Linkage of familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia to chromosome 9q21-q22. Jama, v.284, n.13, Oct 4, p.1664-9. 2000.

Hu, M., W. Retz, *et al.* Promoter polymorphism of the 5-HT transporter and Alzheimer's disease. Neurosci Lett, v.294, n.1, Nov 10, p.63-5. 2000.

Illarioshkin, S. N., I. A. Ivanova-Smolenskaya, *et al.* Clinical and molecular analysis of a large family with three distinct phenotypes of progressive muscular dystrophy. Brain, v.119 ( Pt 6), Dec, p.1895-909. 1996.

Julien, J. P., S. Couillard-Despres, *et al.* Transgenic mice in the study of ALS: the role of neurofilaments. Brain Pathol, v.8, n.4, Oct, p.759-69. 1998.

Kagiwada, S., K. Hosaka, *et al.* The *Saccharomyces cerevisiae* SCS2 gene product, a homolog of a synaptobrevin-associated protein, is an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum and is required for inositol metabolism. J Bacteriol, v.180, n.7, Apr, p.1700-8. 1998.

Kamboh, M. I. Molecular genetics of late-onset Alzheimer's disease. Ann Hum Genet, v.68, n.Pt 4, Jul, p.381-404. 2004.

Kaneto, T., K. Inoue, *et al.* [An autopsied case of progressive spinal muscular atrophy showing tremor and choreiform movement]. Rinsho Shinkeigaku, v.40, n.8, Aug, p.801-6. 2000.

Katila, H., K. Hanninen, *et al.* Polymorphisms of the interleukin-1 gene complex in schizophrenia. Mol Psychiatry, v.4, n.2, Mar, p.179-81. 1999.

Kato, S., M. Oda, *et al.* Motor neuron disease with involvement of the pallido-luysio-nigral system and mesencephalic tegmentum. Clin Neuropathol, v.14, n.4, Jul-Aug, p.241-4. 1995.

Kelley, L. A., R. M. Maccallum, *et al.* Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM. J Mol Biol, v.299, n.2, Jun 2, p.499-520. 2000.

Ki, C. S., D. L. Na, *et al.* Lack of association of the interleukin-1alpha gene polymorphism with Alzheimer's disease in a Korean population. Ann Neurol, v.49, n.6, Jun, p.817-8. 2001.

Kohrmann, M., W. Haubensak, *et al.* Fast, convenient, and effective method to transiently transfect primary hippocampal neurons. J Neurosci Res, v.58, n.6, Dec 15, p.831-5. 1999.

Koller, G., B. Bondy, *et al.* No association between a polymorphism in the promoter region of the MAOA gene with antisocial personality traits in alcoholics. Alcohol Alcohol, v.38, n.1, Jan-Feb, p.31-4. 2003.

Kunugi, H., A. Ueki, *et al.* A novel polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene associated with late-onset Alzheimer's disease. Mol Psychiatry, v.6, n.1, Jan, p.83-6. 2001.

Kunugi, H., A. Ueki, *et al.* Alzheimer's disease and 5-HTTLPR polymorphism of the serotonin transporter gene: no evidence for an association. Am J Med Genet, v.96, n.3, Jun 12, p.307-9. 2000.

Kunugi, H., S. Ishida, *et al.* A functional polymorphism in the promoter region of monoamine oxidase-A gene and mood disorders. Mol Psychiatry, v.4, n.4, Jul, p.393-5. 1999.

Kunugi, H., M. Hattori, *et al.* Serotonin transporter gene polymorphisms: ethnic difference and possible association with bipolar affective disorder. Mol Psychiatry, v.2, n.6, Oct-Nov, p.457-62. 1997.

Kuo, Y. M., P. C. Liao, *et al.* Lack of association between interleukin-1alpha polymorphism and Alzheimer disease or vascular dementia. Alzheimer Dis Assoc Disord, v.17, n.2, Apr-Jun, p.94-7. 2003.

Lacomblez, L., V. Doppler, *et al.* APOE: a potential marker of disease progression in ALS. Neurology, v.58, n.7, Apr 9, p.1112-4. 2002.

Lambrechts, D., E. Storkebaum, *et al.* VEGF: necessary to prevent motoneuron degeneration, sufficient to treat ALS? Trends Mol Med, v.10, n.6, Jun, p.275-82. 2004.

Lambrechts, D., E. Storkebaum, *et al.* VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. Nat Genet, v.34, n.4, Aug, p.383-94. 2003.

Lathrop, G. M., J. M. Lalouel, *et al.* Strategies for multilocus linkage analysis in humans. Proc Natl Acad Sci U S A, v.81, n.11, Jun, p.3443-6. 1984.

Laws, S. M., R. Perneczky, *et al.* TNF polymorphisms in Alzheimer disease and functional implications on CSF beta-amyloid levels. Hum Mutat, v.26, n.1, Jul, p.29-35. 2005.

Lee, J., H. Fukumoto, *et al.* Decreased levels of BDNF protein in Alzheimer temporal cortex are independent of BDNF polymorphisms. Exp Neurol, v.194, n.1, Jul, p.91-6. 2005.

Lefebvre, S., L. Burglen, *et al.* Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. Cell, v.80, n.1, Jan 13, p.155-65. 1995.

Lesca, G., E. Eymard-Pierre, *et al.* Infantile ascending hereditary spastic paralysis (IAHSP): clinical features in 11 families. Neurology, v.60, n.4, Feb 25, p.674-82. 2003.

Lesch, K. P., D. Bengel, *et al.* Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. Science, v.274, n.5292, Nov 29, p.1527-31. 1996.

Li, T., C. Holmes, *et al.* Allelic functional variation of serotonin transporter expression is a susceptibility factor for late onset Alzheimer's disease. Neuroreport, v.8, n.3, Feb 10, p.683-6. 1997.

Li, X. Q., J. W. Zhang, *et al.* Interleukin-1 gene cluster polymorphisms and risk of Alzheimer's disease in Chinese Han population. J Neural Transm, v.111, n.9, Sep, p.1183-90. 2004.

Lleo, A., R. Blesa, *et al.* A novel presenilin 2 gene mutation (D439A) in a patient with early-onset Alzheimer's disease. Neurology, v.57, n.10, Nov 27, p.1926-8. 2001.

Loewen, C. J. e T. P. Levine. A highly conserved binding site in vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP) for the FFAT motif of lipid-binding proteins. J Biol Chem, v.280, n.14, Apr 8, p.14097-104. 2005.

Loewen, C. J., A. Roy, *et al.* A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. Embo J, v.22, n.9, May 1, p.2025-35. 2003.

Majores, M., M. Bagli, *et al.* Allelic association between the D10S1423 marker and Alzheimer's disease in a German population. Neurosci Lett, v.289, n.3, Aug 11, p.224-6. 2000.

Makabe, H. e K. Sakamoto. Evaluation of postural tremor of finger for neuromuscular diseases and its application to the classification. Electromyogr Clin Neurophysiol, v.42, n.4, Jun, p.205-18. 2002.

Mallick, P., R. Weiss, *et al.* The directional atomic solvation energy: an atom-based potential for the assignment of protein sequences to known folds. Proc Natl Acad Sci U S A, v.99, n.25, Dec 10, p.16041-6. 2002.

Marques, W., Jr., M. B. Davis, *et al.* Hereditary motor and autonomic neuropathy 1 maps to chromosome 20q13.2-13.3. Braz J Med Biol Res, v.37, n.11, Nov, p.1757-62. 2004.

Mattei, M. G., J. Melki, *et al.* In situ hybridization of two markers closely flanking the spinal muscular atrophy gene to 5q12----q13.3. Cytogenet Cell Genet, v.57, n.2-3, p.112-3. 1991.

Mattila, K. M., J. O. Rinne, *et al.* Association of an interleukin 1B gene polymorphism (-511) with Parkinson's disease in Finnish patients. J Med Genet, v.39, n.6, Jun, p.400-2. 2002.

Mcculley, M. C., I. N. Day, *et al.* Association between interleukin 1-beta promoter (-511) polymorphism and depressive symptoms in Alzheimer's disease. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, v.124, n.1, Jan 1, p.50-3. 2004.

Mccusker, S. M., M. D. Curran, *et al.* Association between polymorphism in regulatory region of gene encoding tumour necrosis factor alpha and risk of Alzheimer's disease and vascular dementia: a case-control study. Lancet, v.357, n.9254, Feb 10, p.436-9. 2001.

Meisenzahl, E. M., D. Rujescu, *et al.* Association of an interleukin-1beta genetic polymorphism with altered brain structure in patients with schizophrenia. Am J Psychiatry, v.158, n.8, Aug, p.1316-9. 2001.

Melki, J., P. Sheth, *et al.* Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. The French Spinal Muscular Atrophy Investigators. Lancet, v.336, n.8710, Aug 4, p.271-3. 1990.

Messier, C. Diabetes, Alzheimer's disease and apolipoprotein genotype. Exp Gerontol, v.38, n.9, Sep, p.941-6. 2003.

Miller, M. A., V. Q. Nguyen, *et al.* A sperm cytoskeletal protein that signals oocyte meiotic maturation and ovulation. Science, v.291, n.5511, Mar 16, p.2144-7. 2001.

Miller, S. A., D. D. Dykes, *et al.* A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res, v.16, n.3, Feb 11, p.1215. 1988.

Moreira, M. C., S. Klur, *et al.* Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2. Nat Genet, v.36, n.3, Mar, p.225-7. 2004.

Morgan, D., D. M. Diamond, *et al.* A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. Nature, v.408, n.6815, Dec 21-28, p.982-5. 2000.

Murer, M. G., Q. Yan, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Prog Neurobiol, v.63, n.1, Jan, p.71-124. 2001.

Myers, A., P. Holmans, *et al.* Susceptibility locus for Alzheimer's disease on chromosome 10. Science, v.290, n.5500, Dec 22, p.2304-5. 2000.

Nicklin, M. J., J. L. Barton, *et al.* A sequence-based map of the nine genes of the human interleukin-1 cluster. Genomics, v.79, n.5, May, p.718-25. 2002.

Nicoll, J. A., R. E. Mrak, *et al.* Association of interleukin-1 gene polymorphisms with Alzheimer's disease. Ann Neurol, v.47, n.3, Mar, p.365-8. 2000.

Nishimura, A. L., J. R. Oliveira, *et al.* Analysis of the disease risk locus DXS1047 polymorphism in Brazilian Alzheimer patients. Mol Psychiatry, v.5, n.5, Sep, p.563-6. 2000.

Nishimura, A. L., J. R. Oliveira, *et al.* No evidence of association between the D10S1423 locus and Alzheimer disease in Brazilian patients. J Neural Transm, v.108, n.3, p.305-10. 2001.

Nishimura, A. L., M. Mitne-Neto, *et al.* A novel locus for late onset amyotrophic lateral sclerosis/motor neurone disease variant at 20q13. J Med Genet, v.41, n.4, Apr, p.315-20. 2004.

Nishimura, A. L., M. Mitne-Neto, *et al.* A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. Am J Hum Genet, v.75, n.5, Nov, p.822-31. 2004.

Nishimura, A. L., J. R. Oliveira, *et al.* Lack of association between the brain-derived neurotrophin factor (C-270T) polymorphism and late-onset Alzheimer's disease (LOAD) in Brazilian patients. J Mol Neurosci, v.22, n.3, p.257-60. 2004.

Nishimura, A. L., C. Guindalini, *et al.* Monoamine oxidase a polymorphism in Brazilian patients: risk factor for late-onset Alzheimer's disease? J Mol Neurosci, v.27, n.2, p.213-7. 2005.

Nishimura, Y., M. Hayashi, *et al.* Molecular cloning and characterization of mammalian homologues of vesicle-associated membrane protein-associated (VAMP-associated) proteins. Biochem Biophys Res Commun, v.254, n.1, Jan 8, p.21-6. 1999.

Nowotny, P., A. L. Hinrichs, *et al.* Association studies between risk for late-onset Alzheimer's disease and variants in insulin degrading enzyme. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, v.136, n.1, Jul 5, p.62-8. 2005.

Oddo, S., A. Caccamo, *et al.* Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. Neuron, v.39, n.3, Jul 31, p.409-21. 2003.

Olin, D., J. Macmurray, *et al.* Risk of late-onset Alzheimer's disease associated with BDNF C270T polymorphism. Neurosci Lett, v.381, n.3, Jun 24, p.275-8. 2005.

Oliveira, J. R., J. L. Lima Filho, *et al.* The use of apolipoprotein E genotype for preclinical detection of risk's group for Alzheimer's disease. Am J Med Genet, v.74, n.2, Apr 18, p.216-7. 1997.

Oliveira, J. R., R. M. Gallindo, *et al.* The short variant of the polymorphism within the promoter region of the serotonin transporter gene is a risk factor for late onset Alzheimer's disease. Mol Psychiatry, v.3, n.5, Sep, p.438-41. 1998.

Oosthuyse, B., L. Moons, *et al.* Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. Nat Genet, v.28, n.2, Jun, p.131-8. 2001.

Papassotiropoulos, A., M. Tsolaki, *et al.* No association of a non-synonymous PLA2 polymorphism with Alzheimer's disease and disease-related traits. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, v.132, n.1, Jan 5, p.21-3. 2005.

Parton, M. J., W. Broom, *et al.* D90A-SOD1 mediated amyotrophic lateral sclerosis: a single founder for all cases with evidence for a Cis-acting disease modifier in the recessive haplotype. Hum Mutat, v.20, n.6, Dec, p.473. 2002.

Pastorino, L., F. Colciaghi, *et al.* Presenilin 2 mutation does not influence expression and concentration of APP forms in human platelets. Mol Med, v.6, n.10, Oct, p.816-24. 2000.

Pearn, J. Autosomal dominant spinal muscular atrophy: a clinical and genetic study. J Neurol Sci, v.38, n.2, Sep, p.263-75. 1978.

Pennetta, G., P. Hiesinger, *et al.* Drosophila VAP-33A directs bouton formation at neuromuscular junctions in a dosage-dependent manner. Neuron, v.35, n.2, Jul 18, p.291-306. 2002.

Poduslo, S. E. e X. Yin. Chromosome 12 and late-onset Alzheimer's disease. Neurosci Lett, v.310, n.2-3, Sep 14, p.188-90. 2001.

Poorkaj, P., D. Tsuang, *et al.* TAU as a susceptibility gene for amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia complex of Guam. Arch Neurol, v.58, n.11, Nov, p.1871-8. 2001.

Qiu, W. Q., D. M. Walsh, *et al.* Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. J Biol Chem, v.273, n.49, Dec 4, p.32730-8. 1998.

Rao, M. V. e R. A. Nixon. Defective neurofilament transport in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis: a review. Neurochem Res, v.28, n.7, Jul, p.1041-7. 2003.

Richieri-Costa, A., A. Rogatko, *et al.* Autosomal dominant late adult spinal muscular atrophy, type Finkel. Am J Med Genet, v.9, n.2, p.119-28. 1981.

Riederer, P., W. Danielczyk, *et al.* Monoamine oxidase-B inhibition in Alzheimer's disease. Neurotoxicology, v.25, n.1-2, Jan, p.271-7. 2004.

Riemenschneider, M., S. Schwarz, *et al.* A polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is associated with Alzheimer's disease in patients lacking the Apolipoprotein E epsilon4 allele. Mol Psychiatry, v.7, n.7, p.782-5. 2002.

Rosen, D. R., T. Siddique, *et al.* Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature, v.362, n.6415, Mar 4, p.59-62. 1993.

Ruddy, D. M., M. J. Parton, *et al.* Two families with familial amyotrophic lateral sclerosis are linked to a novel locus on chromosome 16q. Am J Hum Genet, v.73, n.2, Aug, p.390-6. 2003.

Sabol, S. Z., S. Hu, *et al.* A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. Hum Genet, v.103, n.3, Sep, p.273-9. 1998.

Said, G., N. Bathien, *et al.* Peripheral neuropathies and tremor. Neurology, v.32, n.5, May, p.480-5. 1982.

Saiki, R. K., S. Scharf, *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, v.230, n.4732, Dec 20, p.1350-4. 1985.

Sakai, A., H. Ujike, *et al.* No association between the insulin degrading enzyme gene and Alzheimer's disease in a Japanese population. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, v.125, n.1, Feb 15, p.87-91. 2004.

Samochowiec, J., K. P. Lesch, *et al.* Association of a regulatory polymorphism in the promoter region of the monoamine oxidase A gene with antisocial alcoholism. Psychiatry Res, v.86, n.1, Apr 19, p.67-72. 1999.

Sanan, D. A., K. H. Weisgraber, *et al.* Apolipoprotein E associates with beta amyloid peptide of Alzheimer's disease to form novel monofibrils. Isoform apoE4 associates more efficiently than apoE3. J Clin Invest, v.94, n.2, Aug, p.860-9. 1994.

Sapp, P. C., B. A. Hosler, *et al.* Identification of two novel loci for dominantly inherited familial amyotrophic lateral sclerosis. Am J Hum Genet, v.73, n.2, Aug, p.397-403. 2003.

Scarmeas, N., J. Brandt, *et al.* Association between the APOE genotype and psychopathologic symptoms in Alzheimer's disease. Neurology, v.58, n.8, Apr 23, p.1182-8. 2002.

Schenk, D., M. Hagen, *et al.* Current progress in beta-amyloid immunotherapy. Curr Opin Immunol, v.16, n.5, Oct, p.599-606. 2004.

Schenk, D., R. Barbour, *et al.* Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. Nature, v.400, n.6740, Jul 8, p.173-7. 1999.

Schuback, D. E., E. L. Mulligan, *et al.* Screen for MAOA mutations in target human groups. Am J Med Genet, v.88, n.1, Feb 5, p.25-8. 1999.

Seripa, D., M. G. Matera, *et al.* Genotypes and haplotypes in the IL-1 gene cluster: analysis of two genetically and diagnostically distinct groups of Alzheimer patients. Neurobiol Aging, v.26, n.4, Apr, p.455-64. 2005.

Shibata, N., T. Ohnuma, *et al.* No genetic association between tumour necrosis factor receptor II 196R polymorphism and Japanese sporadic Alzheimer's disease. Psychiatr Genet, v.14, n.1, Mar, p.53-5. 2004.

Siddique, T., M. A. Pericak-Vance, *et al.* Lack of association between apolipoprotein E genotype and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Neurogenetics, v.1, n.3, Mar, p.213-6. 1998.

Siddique, T., D. A. Figlewicz, *et al.* Linkage of a gene causing familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic-locus heterogeneity. N Engl J Med, v.324, n.20, May 16, p.1381-4. 1991.

Sisodia, S. S. e P. H. St George-Hyslop. gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? Nat Rev Neurosci, v.3, n.4, Apr, p.281-90. 2002.

Skehel, P. A., R. Fabian-Fine, *et al.* Mouse VAP33 is associated with the endoplasmic reticulum and microtubules. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.3, Feb 1, p.1101-6. 2000.

Skehel, P. A., K. C. Martin, *et al.* A VAMP-binding protein from *Aplysia* required for neurotransmitter release. Science, v.269, n.5230, Sep 15, p.1580-3. 1995.

Skene, J. P. e D. W. Cleveland. Hypoxia and Lou Gehrig. Nat Genet, v.28, n.2, Jun, p.107-8. 2001.

Slifer, M. A., E. R. Martin, *et al.* The ubiquilin 1 gene and Alzheimer's disease. N Engl J Med, v.352, n.26, Jun 30, p.2752-3; author reply 2752-3. 2005.

Sobel, E. e K. Lange. Descent graphs in pedigree analysis: applications to haplotyping, location scores, and marker-sharing statistics. Am J Hum Genet, v.58, n.6, Jun, p.1323-37. 1996.

Soussan, L., D. Burakov, *et al.* ERG30, a VAP-33-related protein, functions in protein transport mediated by COPI vesicles. J Cell Biol, v.146, n.2, Jul 26, p.301-11. 1999.

Souza, D. R., M. R. De Godoy, *et al.* Association of apolipoprotein E polymorphism in late-onset Alzheimer's disease and vascular dementia in Brazilians. Braz J Med Biol Res, v.36, n.7, Jul, p.919-23. 2003.

Stamer, K., R. Vogel, *et al.* Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. J Cell Biol, v.156, n.6, Mar 18, p.1051-63. 2002.

Storkebaum, E., D. Lambrechts, *et al.* Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. Nat Neurosci, v.8, n.1, Jan, p.85-92. 2005.

Storkebaum, E., D. Lambrechts, *et al.* VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. Bioessays, v.26, n.9, Sep, p.943-54. 2004.

Takata, R. I., C. E. Speck Martins, *et al.* A new locus for recessive distal spinal muscular atrophy at Xq13.1-q21. J Med Genet, v.41, n.3, Mar, p.224-9. 2004.

Takehashi, M., S. Tanaka, *et al.* Association of monoamine oxidase A gene polymorphism with Alzheimer's disease and Lewy body variant. Neurosci Lett, v.327, n.2, Jul 19, p.79-82. 2002.

Terwilliger JD & Ott J. Handbook of human Genetic Location. The Johns Hopkins Press. 1994.

Tomita, T., K. Maruyama, *et al.* The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid beta protein ending at the 42nd (or 43rd) residue. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.5, Mar 4, p.2025-30. 1997.

Toyoshima, I., M. Sugawara, *et al.* Kinesin and cytoplasmic dynein in spinal spheroids with motor neuron disease. J Neurol Sci, v.159, n.1, Jul 15, p.38-44. 1998.

Tsai, S. J. Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between major depression and Alzheimer's disease? Med Hypotheses, v.61, n.1, Jul, p.110-3. 2003.

Tsai, S. J., H. C. Liu, *et al.* Lack of association between the interleukin-1alpha gene C(-889)T polymorphism and Alzheimer's disease in a Chinese population. Neurosci Lett, v.343, n.2, Jun 5, p.93-6. 2003.

Tsai, S. J., C. J. Hong, *et al.* Association study for a functional serotonin transporter gene polymorphism and late-onset Alzheimer's disease for Chinese patients. Neuropsychobiology, v.44, n.1, p.27-30. 2001.

Uyama, E., K. Yamaguchi, *et al.* *VI World Muscle Society*. 2001

Weiler, T., C. R. Greenberg, *et al.* Limb-girdle muscular dystrophy and Miyoshi myopathy in an aboriginal Canadian kindred map to LGMD2B and segregate with the same haplotype. Am J Hum Genet, v.59, n.4, Oct, p.872-8. 1996.

Weinstock, M., N. Kirschbaum-Slager, *et al.* Neuroprotective effects of novel cholinesterase inhibitors derived from rasagiline as potential anti-Alzheimer drugs. Ann N Y Acad Sci, v.939, Jun, p.148-61. 2001.

Weir, M. L., A. Klip, *et al.* Identification of a human homologue of the vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein of 33 kDa (VAP-33): a broadly expressed protein that binds to VAMP. Biochem J, v.333 ( Pt 2), Jul 15, p.247-51. 1998.

Wenham, P. R., W. H. Price, *et al.* Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR. Lancet, v.337, n.8750, May 11, p.1158-9. 1991.

Wyles, J. P., C. R. McMaster, *et al.* Vesicle-associated membrane protein-associated protein-A (VAP-A) interacts with the oxysterol-binding protein to modify export from the endoplasmic reticulum. J Biol Chem, v.277, n.33, Aug 16, p.29908-18. 2002.

Xia, W. Amyloid metabolism and secretases in Alzheimer's disease. Curr Neurol Neurosci Rep, v.1, n.5, Sep, p.422-7. 2001.

Yang, Y., A. Hentati, *et al.* The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. Nat Genet, v.29, n.2, Oct, p.160-5. 2001.

Youdim, M. B. e J. J. Buccafusco. CNS Targets for multi-functional drugs in the treatment of Alzheimer's and Parkinson's diseases. J Neural Transm, v.112, n.4, Apr, p.519-37. 2005.

Youdim, M. B. e M. Weinstock. Therapeutic applications of selective and non-selective inhibitors of monoamine oxidase A and B that do not cause significant tyramine potentiation. Neurotoxicology, v.25, n.1-2, Jan, p.243-50. 2004.

Zatz, M., F. De Paula, *et al.* The 10 autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscul Disord, v.13, n.7-8, Sep, p.532-44. 2003.

Zatz, M., M. Vainzof, *et al.* Limb-girdle muscular dystrophy: one gene with different phenotypes, one phenotype with different genes. Curr Opin Neurol, v.13, n.5, Oct, p.511-7. 2000.

Zatz, M., C. Penha-Serrano, *et al.* A malignant form of neurogenic muscular atrophy in adults, with dominant inheritance. J Genet Hum, v.19, n.4, Dec, p.337-54. 1971.

Zubenko, G. S., H. B. Hughes, *et al.* A genome survey for novel Alzheimer disease risk loci: results at 10-cM resolution. Genomics, v.50, n.2, Jun 1, p.121-8. 1998.

Zubenko, G. S., H. B. Hughes, 3rd, *et al.* Clinical and neurobiological correlates of D10S1423 genotype in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*, v.46, n.6, Sep 15, p.740-9. 1999.

Zubenko, G. S., H. B. Hughes, *et al.* Clinical and neurobiological correlates of DXS1047 genotype in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*, v.46, n.2, Jul 15, p.173-81. 1999.

#### Referências eletrônicas

The ALS online database for mutations in ALS related genes,  
<http://alsod1.iop.kcl.ac.uk/>

Northwestern University Medical School,  
<http://www.neurogenetics.northwestern.edu/index.jsp>

The ALS association, <http://www.alsa.org>  
Motor neurone disease association (MND),  
<http://www.mnda.org/full-site/home.shtml>

Scottish Motor Neurone Disease Association, <http://www.scotmnd.org.uk/>  
International Alliance of ALS/MND Associations, <http://www.alsmndalliance.org/>  
Associação Brasileira de esclerose lateral amiotrófica,  
<http://www.tudosobreela.com.br>

Alzforum,  
<http://www.alzforum.org/res/com/gen/alzgene/geneoverview.asp?geneid=109>  
Movimento em prol da vida, [http://www.movitae.bio.br/patologias\\_ela.htm](http://www.movitae.bio.br/patologias_ela.htm)  
Aventis Pharmaceuticals Products Inc., <http://www.alsinfo.com/index.jsp> e  
[http://www.aventispharma-us.com/PIs/rilutek\\_TXT.html](http://www.aventispharma-us.com/PIs/rilutek_TXT.html)

Oligoengine, [www.oligoengine.com](http://www.oligoengine.com)  
Ensembl database (marcadores de microssatélite),  
[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/textview?species=Homo\\_sapiens&idx=Marker&q=](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/textview?species=Homo_sapiens&idx=Marker&q=)

National Center for Biotechnology Information (NCBI) - marcadores de microssatélite  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unists&cmd=search&term=>

#### Figuras da tese

<http://www.mdausa.org/publications/alscare/what.htm>)

<http://alsod1.iop.kcl.ac.uk/>

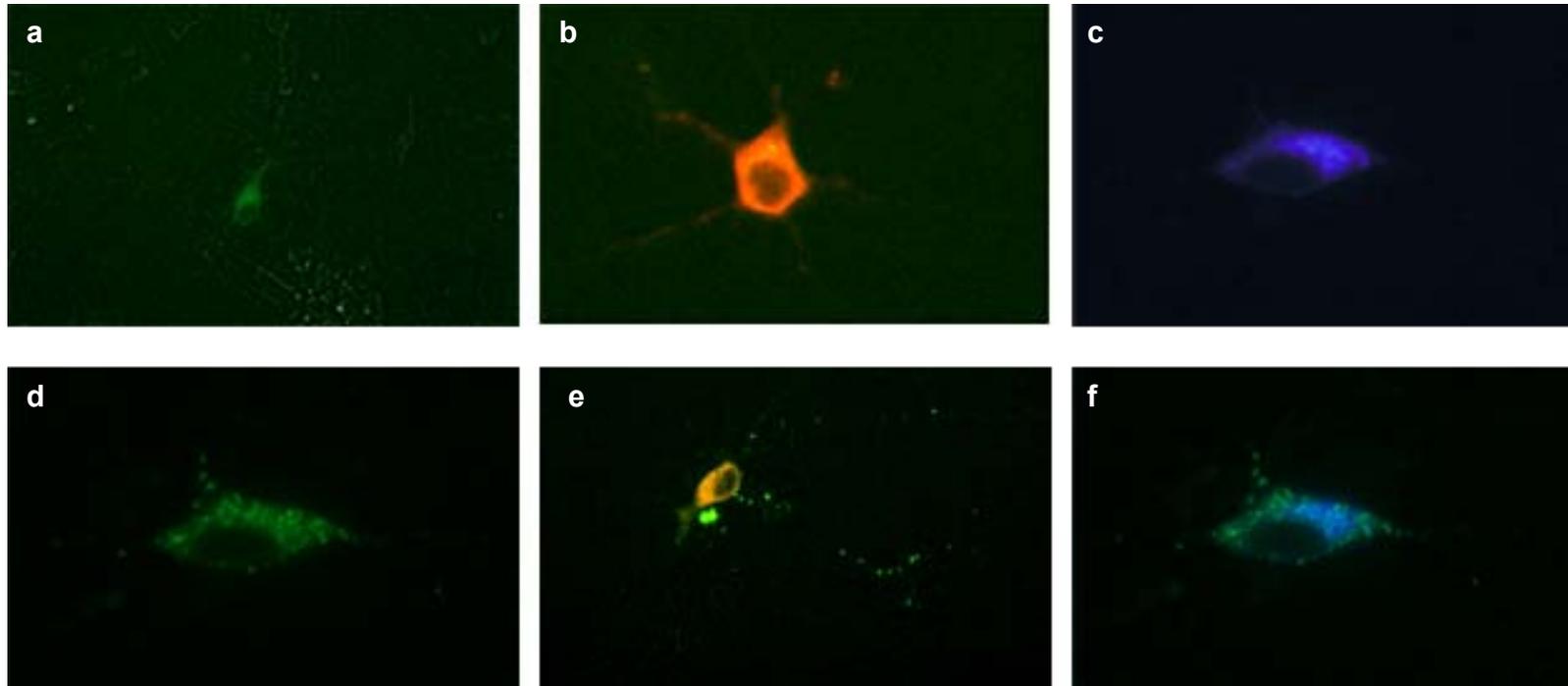
[http://www.mdausa.org/publications/als/als4\\_6motorn.html](http://www.mdausa.org/publications/als/als4_6motorn.html)

[http://www.mdausa.org/publications/als/als4\\_3.html](http://www.mdausa.org/publications/als/als4_3.html)

## Capítulo 13

---

## **Anexos**



*Figura. 18: Expressão da VAP-B em neurônios de camundongo. a) expressão da VAP-B selvagem (verde); b) marcador de retículo endoplasmático (RE) pDsRed-ER (vermelho); c) marcador de complexo de golgi (CG) pGolgi-ECFP (azul); d) expressão da VAP-B mutante (P56S) e formação de agregados celulares; sobreposição das imagens do VAP-B mutante e o marcador de RE (e) e com o*

*marcador de CG (f). Observe que a VAP-B mutante não co-localiza com o RE e o CG. Imagens obtidas pelo Dr. Paul Skehel.*

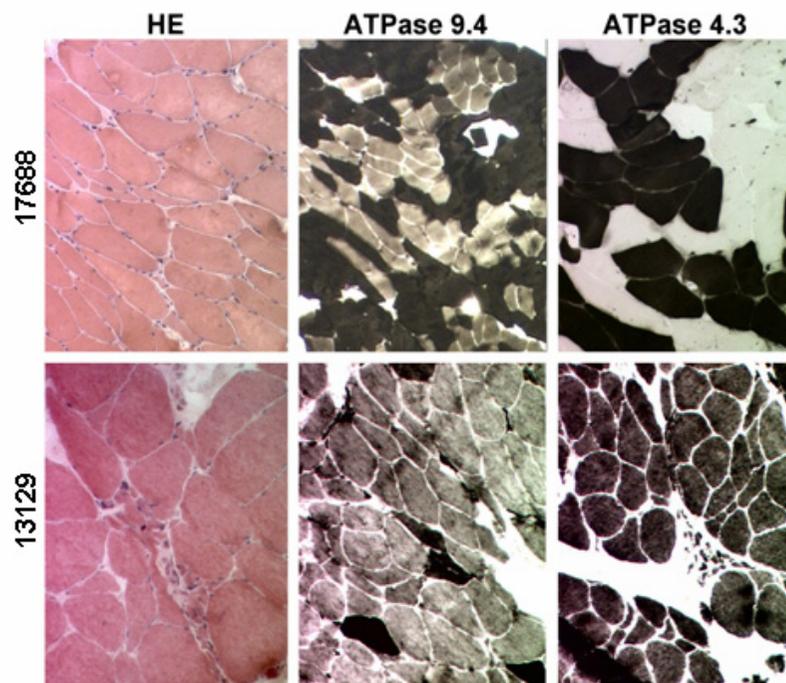


Figura. 19: Biópsia muscular de dois pacientes portadoras da mutação P56S do gene *VAP-B*. Observa-se um padrão neurogênico com grupos de fibras anguladas grandes e pequenas. Imagem obtida pela Dra. Mariz Vainzof.



Figura. 20: Fotos de um paciente com mutação no gene *VAP-B*. a) este paciente apresenta fraqueza muscular dos membros superiores e inferiores, além de um aumento na circunferência abdominal. b) Pé cavo. Imagens obtidas por Agnes Nishimura e Dr. Fernando Kok.

Tabela 14: Lista de pacientes com mutação no gene *VAP-B*. Oito famílias foram incluídas nesse estudo.

Família	N° reg	ID	idade	idade de inicio	cadeira de rodas	observação
1	C10986	V:157	?	?	-	falecida
1	C10989	VI:50	58	45	52	insuficiência respiratória, diabetes, disfagia e hipercolesterolemia
1	C10996	VI:57	51	44	-	-
1	C11002	V:47	64	?	-	insuficiência respiratória
1	C11005	VI:73	57	42	54	disfagia, hipercolesterolemia e pé cavo
1	C11009	V:50	70	50	?	falecida
1	C11013	V:49	80	75	-	-
1	C11045	VI:63	-	-	-	-
1	C12669	VI:40	64	50	58	insuficiência respiratória, traqueostomia e disfagia
1	C14827	VI:52	63	55	-	falecido (diabetes, disfagia e hipercolesterolemia, cardíaco)
1	C14839	VI:53	63	55	-	-
1	C17754	VI:15	54	46	-	disfagia
1	C17763	VI:46	63	52	60	falecido (diabetes, disfagia e hipercolesterolemia)
1	C17765	VI:20	54	53	-	-
1	C19754	VI:8	46	36	-	disfagia e depressão
1	C20821	VI:31	51	39	48	-

1	C20914	VI:33	48	42	-	-
1	C20915	VI:37	42	38	-	-
1	C20916	VI:28	57	47	55	insuficiência respiratória, traqueostomia e disfagia
1	C20917	VI:32	?	?	-	-
1	C21076	VI:41	63	42	-	amiotrofia proximal leve
1	C21122	VI:85	51	42	47	disfagia e insuficiência respiratória
1	C21123	VI:87	43	40	-	câncer e depressão
1	C21124	VI:15	55	53	-	amiotrofia proximal leve
1	C21125	VI:76	51	48	-	insuficiência respiratória e disfagia
1	C21126	VI:78	47	42	-	disfagia, insuficiência respiratória e pé cavo
2	C10999	IV:11	52	41	-	falecida
2	C19756	IV:9	54	40	-	hipercolesterolemia
3	C17686	V:18	50	40	-	falecida
3	C17687	V:20	50	43	47	-
3	C17688	V:22	53	30	51	-
3	C17886	V:66	51	37	?	-
3	C17925	V:24	48	45	-	-
3	C18037	V:45	60	47	-	-
3	C18717	V:60	49	37	-	disfagia e disfonia
3	C18721	V:33	59	25	47	cifose, disfagia, disfonia e insuficiência respiratória
3	C18725	V:50	53	44	-	disfagia
3	C18734	V:1	43	31	-	-
3	C19459	V:39	51	?	-	-
3	C17924	V:28	46	41	-	-

4	C12377	IV:17	57	52	-	insuficiência respiratória e hepatite C
4	C20382	V:6	50	38	-	insuficiência respiratória e hipercolesterolemia
4	C20448	V:2	50	42	46	insuficiência respiratória e hipercolesterolemia
4	C20896	IV:11	66	55	-	-
5	C20246	III:5	59	38	-	insuficiência respiratória
6	C19857	III:2	58	47	55	traqueostomia
6	C21029	III:3	56	?	-	síndrome do pânico
7	C17788	IV:14	61	48	57	-
8	C18584	IV:11	61	37	55	sialorréia e insuficiência respiratória
8	C19759	IV:34	58	40	-	disfonia, cifose
8	C21164	IV:33	60	49	56	disfonia, disfagia, insuficiência respiratória
8	C21165	IV:38	54	50	-	disfonia, disfagia, insuficiência respiratória

## **Informação sobre a ELA-8 para os médicos**

(redigido pelo Dr. Fernando Kok)

### **O que é a ELA-8**

A ELA-8 é uma forma de esclerose lateral amiotrófica geneticamente determinada, de herança autossômica dominante, e que foi identificada em diversas famílias no Brasil. Ela é estudada desde a década de 60, mas o gene responsável por essa condição, localizado no cromossomo 20 e conhecido com o VAP-B, foi identificado somente em 2004 (Nishimura e cols). Todos os portadores dessa condição no Brasil compartilham uma mesma mutação nesse gene. Como se trata de uma condição de herança dominante, a presença da mutação em um único alelo é suficiente para ocasionar a doença. Existe significativa variabilidade da idade de início e velocidade de progressão da doença. Indivíduos de ambos os sexos podem ser igualmente afetados e a doença parece que se comporta da mesma forma em homens e mulheres.

### **Qual as características clínicas da ELA-8?**

Informações coligidas a partir da observação de pacientes de oito famílias com ELA8.

A idade de início da ELA-8 varia entre cerca de 35 e 50 anos de idade, e os sintomas principais são:

*1. Fase prodrômica, que ocorre meses ou poucos anos antes da instalação da fraqueza muscular.*

Caracteriza-se por câimbras nos membros e na musculatura dorsal e abdominal, fasciculações que afetam de forma indistinta qualquer músculo esquelético, exceto os da face e dor na região da coluna vertebral, que se irradia da região da nuca para o dorso.

*2. Fase sintomática inicial (duração: 2-5 anos)*

Caracteriza-se por fraqueza muscular de predomínio PROXIMAL, de início em membros inferiores, levando a progressiva dificuldade para caminhar. Posteriormente, há também comprometimento de musculatura proximal de membros superiores, que pode ser assimétrico; quando isso ocorre, o membro superior dominante costuma ser mais intensamente afetado. Os reflexos miotáticos podem se mostrar desproporcionalmente vivos/exaltados, mas com o progredir da doença, vão se extinguindo. O cutâneo plantar pode se achar em extensão (sinal de Babinski) ou ser indiferente. O cutâneo abdominal em geral acha-se abolido. As fasciculações e câimbras estão presentes, mas de forma menos intensa que na fase prodrômica. Pode-se notar amiotrofias em cintura pélvica e escapular o observa-se tremor de atitude das mãos, que é assíncrono, arrítmico e que se dá de forma alternada nos dedos (polimioclonia). Com frequência, ocorrem engasgos. Observa-se ainda significativo aumento da circunferência abdominal, possivelmente secundária a fraqueza de sua musculatura e raramente encontra-se alterações da sensibilidade.

### **3. Fase sintomática avançada (duração: 2-5 ou + anos)**

A perda da marcha independente marca o início dessa fase. O déficit motor permanece mais intenso em musculatura proximal, e a progressão da fraqueza de membros inferiores pode dificultar ou impedir o braço acima do plano dos ombros. A musculatura das mãos e dos pés é afetada apenas tardiamente na evolução da doença; a musculatura facial parece ser poupada e a cervical atingida tardiamente. A língua pode ter fasciculações e amiotrofia e a motricidade ocular é normal. Em alguns pacientes, observa-se ainda diminuição da sensibilidade tátil e dolorosa com padrão de “bota” ou, mais raramente, “luva”, e redução da sensibilidade vibratória em membros inferiores. Outros sinais de neuropatia periférica, como pés cavos, hipotermia e alteração da perfusão periférica podem estar presentes. Podem ocorrer dificuldades respiratórias e alguns pacientes necessitam de assistência ventilatória e traqueostomia.

Não é possível prever a progressão da doença, pois se observou pacientes com progressão rápida (até 5 anos) e outros com progressão lenta (10-20 anos).

### **O que mostram os exames complementares na ELA-8**

A creatino-quinase (CK) sérica pode se achar elevada, especialmente em fases iniciais da doença. A eletroneuromiografia mostra alterações sugestivas de comprometimento do motoneurônio. A ressonância magnética de crânio, realizada em número reduzido de pacientes, não revelou anormalidades. Exames como LCR e biópsia de músculo também não contribuíram para o diagnóstico.

### **Como o diagnóstico pode ser confirmado?**

O diagnóstico de ELA-8, por mutação do gene VAP-B, pode ser confirmado por meio do seqüenciamento do gene. Nas famílias brasileiras em que essa condição foi estudada, todos apresentavam a mesma mutação. Em todos os casos até o presente estudados, havia uma história familiar de doença neuromuscular iniciando na vida adulta, e as famílias residiam ou tinham ancestrais procedentes da região serrana do Rio de Janeiro ou da Zona da Mata de Minas Gerais (Juiz de Fora e adjacências).

Esse teste genético é feito sempre após consentimento informado e tratado de forma sigilosa. Ele é oferecido apenas indivíduos que apresentem sintomas clínicos e NÃO DEVE ser realizado em indivíduos assintomáticos que pertençam a famílias de risco. A penetrância dessa doença parece ser alta, mas desconhece-se se existem portadores assintomáticos em idade avançada.

### **O que pode ser feito para os portadores de ELA-8?**

Não há, até o momento, tratamento específico para essa doença. Medidas de apoio, como fisioterapia, ajudam de forma significativa à manutenção da atividade física e estão recomendadas. O uso de medicamentos como o Riluzole (Rilutek), que auxiliam no tratamento de formas esporádicas de ALS, pode ser considerado, mas sua eficácia para a ELA-8 ainda não foi demonstrada.

# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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