FREDERICO MENNUCCI DE HAIDAR JORGE

**Correlação clínico-molecular na esclerose lateral amiotrófica
fundamentada pelos achados da expressão gênica
no nervo extensor curto do hálux**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título Doutor em
Ciências

Programa de Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Gerson Chadi

**São Paulo
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Jorge, Frederico Mennucci de Haidar
Correlação clínico-molecular na esclerose lateral
amiotrófica fundamentada pelos achados da expressão
gênica no nervo extensor curto do hálux / Frederico
Mennucci de Haidar Jorge. -- São Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Neurologia.
Orientador: Gerson Chadi.

Descritores: 1.Esclerose lateral amiotrófica
2.Células de Schwann 3.Neurônios motores
4.Neurodegeneração 5.Biologia molecular

USP/FM/DBD-012/18

Responsável: Kátia Maria Bruno - CRB-8/6008

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurologia Translacional (LIM-45) e no Ambulatório de ELA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), e recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

*Aos pacientes portadores de Esclerose Lateral Amiotrófica, que,
mesmo com uma doença tão dura, mantêm a chama da vida acesa, e lutam e
vivem cada instante dela ensinando, naturalmente, a todos sobre assertividade,
perseverança, vontade, amor e fé.*

AGRADECIMENTOS

Esta tese de doutorado é o resultado de uma somatória de esforços de um grande número de pessoas e, certamente, seria impossível a sua conclusão sem a participação de todos. Assim, é com grande alegria e satisfação que agradeço:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gerson Chadi, cuja competência como pesquisador, cientista e líder garante a segurança e a base para avançarmos em caminhos ainda desconhecidos, porém ávidos e carentes para serem percorridos. Obrigado pelo exemplo de lisura e determinação. Agradeço, sobretudo, pela oportunidade de trabalhar nesse grande projeto de pesquisa em ELA, pela orientação, pelas correções e pelos incentivos.

Ao Dr. Dagoberto Callegaro, co-orientador desta tese, que, com sua competência como neurologista e integridade como ser humano, serve como inspiração para trabalharmos e atendermos melhor os pacientes. Obrigado por todas as oportunidades e pelo apoio que me deu. Agradeço às inúmeras conversas sobre os mais variados assuntos, suportes e discussões de casos. É um prazer trabalhar com o senhor.

Aos meus pais, Guilherme e Priscila, por todo amor, pelo incentivo, pelo suporte e pela confiança que me dão e que tornam, assim, possível na minha vida que eu visualize e percorra os caminhos que eu escolho. Ao meu pai, também pelo exemplo e pela inspiração na escolha da carreira médica. Aos meus irmãos, Gustavo e Henrique, por serem irmãos e amigos tão queridos, por serem exemplos de pessoas e por seus comportamentos, e por serem alicerces na minha vida.

Aos meus colegas e amigos do grupo de doenças desmielinizantes e doença do neurônio motor, que, no decorrer desses 7 anos, me premiaram com o prazer da convivência e do aprendizado diário. Tive a sorte e oportunidade de trabalhar e aprender com todos vocês, que tornam o ambiente que, por natureza, é muito difícil em um lugar agradável e prazeroso de se trabalhar. Obrigado por todo o suporte dado neste período, o que me proporcionou a possibilidade de realizar esta tese. Obrigado às Dras. Samira Apostolos, Renata Simm, Maria Fernanda Mendes, Luana Oliveira, Camila Galvão e Paula Zago, e aos Drs. Douglas Sato, Thiago Junqueira, Mateus Boaventura, Herval Neto e Alexandre Marques.

À Dra. Jéssica Maximino, uma pessoa muito íntegra, e uma cientista ímpar e excepcional, que, sem seus conhecimentos e capacidades, esta tese não existiria. Obrigado por todos os ensinamentos e pela paciência comigo.

Aos Drs. Edmar Zanotteli, Samira Apostolos e Angelina Lino, pelas correções e considerações feitas na qualificação, fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Roberto Martins, pela disponibilidade e competência na realização e idealização das biópsias de pacientes e controles.

Aos funcionários do Departamento e do Ambulatório de Neurologia: Reiko, Sueli, Thais, Vera, Carlinhos, Enf. Maria José, Val e Vanessa, que estiveram sempre dispostos e solícitos a ajudar.

Às voluntárias Adelaide (*in memoriam*), Vera, Maria Helena, esta que cuida e organiza com tanto carinho e leveza o ambulatório de 2ª feira, ajudando a tornar o ambiente mais calmo e produtivo.

Aos meus colegas do ambulatório de ELA do HCFMUSP com quem tenho enorme prazer em trabalhar junto e que são peças fundamentais para exercermos um atendimento de excelência aos pacientes. À fonoaudióloga Amanda Mendes, ao fisioterapeuta Vinicius Iamonti e às terapeutas ocupacionais Roberta Rolim e Juliana Conti.

A toda equipe do LIM 45, pelo excelente profissionalismo e ambiente cordial. Em especial, a Chrystian Alves, a Gilmar, à Iolanda Orue, à Maiara Gedo, a Felipe Delatorre, à Joyce Gilio e à Florence Dinucci.

À família Cervone, por toda a torcida e pelo apoio ao longo dessa jornada.

Um agradecimento especial a todos os pacientes que participaram desse estudo, que as suas células possam representar um sopro de esperança para o entendimento e tratamento da ELA. E aos pacientes do ambulatório que tento cuidar e ajudar, mas, com certeza, troco e aprendo muito com a franqueza e força deles sobre o que é o viver, aprendo a não reclamar da vida, a viver e fazer antes de me queixar sobre qualquer coisa.

À pós-graduação em Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. À FAPESP, pelo financiamento do projeto regular (2010/20457-7), fundamental para que eu pudesse realizar este trabalho.

E, finalmente, a minha esposa, Suzana, pessoa mais importante da minha vida, que divido cada passo que dou, que tenho a troca e o apoio na medida necessária. Obrigado por todo o suporte, amor e incentivo. Com você, faz mais sentido o meu caminhar. Deixo, aqui, também, o meu agradecimento a minha filha, Laura, que, com menos de um mês que nos conhecemos, já me encheu de ensinamentos e amor. Um verdadeiro e puro combustível para seguir e viver da melhor maneira possível.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE QUADROS

LISTA TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	3
1.1 A Esclerose Lateral Amiotrófica	3
1.2 Células gliais e a patogênese da ELA.....	8
1.3 A célula de Schwann e a desnervação periférica na ELA.....	9
1.4 A Expressão gênica na ELA	13
2 JUSTIFICATIVA	19
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
3.2.1 Elaboração do banco de dados informatizado para registro e análise dos detalhes clínicos dos pacientes com ELA acompanhados no ambulatório de ELA do HC-FMUSP.....	23
3.2.2 Utilizar <i>microarrays</i> de DNA e técnicas de bioinformática para analisar o perfil de expressão gênica no nervo motor, nervo extensor curto do hálux ainda funcional, de doentes com ELA, formas bulbar e espinhal, e comparar com os sujeitos-controle.	23
3.2.3 Eleição de genes para validação pela técnica do PCR em tempo real e análises detalhadas da participação deles como alvos terapêuticos possíveis na ELA.....	23
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	27
4.1 Diagnóstico	27
4.2 Registro da evolução dos parâmetros clínicos no banco de dados.....	27
4.3 Critérios de inclusão, não inclusão e exclusão	28
4.4 Pacientes e biópsias do nervo periférico	28
4.5 Experimento de <i>microarray</i> do nervo motor de pacientes com ELA	32
4.6 Análises de bioinformática.....	35

4.7 Ensaios de PCR quantitativo (qRT-PCR).....	36
5 RESULTADOS	41
5.1 Pacientes atendidos no ambulatório ELA do HC-FMUSP	41
5.2 Biópsias do nervo periférico de pacientes com ELA e controles	57
5.3 Análise do <i>Microarray</i>	59
5.4 Análises enriquecidas para resultados de <i>Microarray</i>	65
5.4.1 Análises enriquecidas para vias do KEGG (Tabela 5).....	65
5.4.2 Análises enriquecidas para <i>gene ontology</i>	65
5.4.3 Análise de rede de interação de genes desregulados	70
5.5 Ensaios de PCR quantitativo (qPCR)	74
6 DISCUSSÃO	79
7 CONCLUSÕES.....	93
8 ANEXOS	97
8.1 Anexo A - Escala ALFRS.....	97
8.2 Anexo B - Cópia do parecer de aprovação no Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CaPPesq.....	99
8.3 Anexo C - Escala MRC (do inglês, <i>Medical Research Council</i>).....	100
8.4 Anexo D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para biópsia de nervo periférico.....	101
8.5 Anexo E - Banco de dados Informatizado para registro da evolução clínica dos pacientes com ELA acompanhados no ambulatório de ELA do HC-FMUSP.....	104
9 REFERÊNCIAS	123

LISTA DE ABREVIATURAS

ALS	Do Inglês, <i>Amyotrophic Lateral Sclerosis</i>
ALSFRS	Do Inglês, <i>Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale</i>
ANOVA	Análise de Variância
AK1	Do Inglês, Adenylate Kinase 1
BAX	Do Inglês, <i>Bcl-2-Associated X Protein</i>
CAPPesq	Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
DNAc	DNA complementar
DAVID	Do Inglês, <i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
DNA	Do Inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DNM	Doenças do Neurônio Motor
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
ENMG	Eletroneuromiografia
EPS8	Do Inglês, <i>Epidermal Growth Factor Receptor Substrate 8</i>
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ETV3	Do Inglês, <i>Ets Variant 3</i>
FBR-MuSV	<i>Finkel-Biskis-Reilly Murine Sarcoma Virus</i>
FAU	Do Inglês, <i>FBR-MuSV Associated Ubiquitously</i>
GFAP	Do Inglês, <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GOCA	Do Inglês, <i>Gene Ontology Consorciun Anottation</i>
GO	Do Inglês, <i>Gene Ontology</i>
HC/FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HEK93	<i>Human Embryonic Kidney 293 Cells</i>
HOXA	Do inglês, <i>Homeobox</i>
HUVECs	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
KEGG	Do Inglês, <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LIM	Laboratório de Investigação Médica

LRPPRC	Do Inglês, <i>Leucine-Rich PPR Motif-Containing Protein</i>
MRC	Do Inglês, <i>Medical Research Council</i>
NAD	Do Inglês, <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NGF	Do Inglês, <i>Nerve Growth Factor</i>
NM	Neurônios Motores
qPCR	Do Inglês, <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	Do Inglês, <i>Ribonucleic Acid</i>
RPL23	Do Inglês, <i>Ribosomal Protein L23</i>
RPL29	Do Inglês, <i>Ribosomal Protein L29</i>
TDP-43	Do Inglês, <i>TAR-DNA Binding Protein 43</i>
UBA52	Do Inglês, <i>Ubiquitin A-52 Residue Ribosomal Protein Fusion Product 1</i>
UXT	Do Inglês, <i>Ubiquitously Expressed Transcript</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema ilustrando os principais mecanismos descritos para as ações autócrinas e parácrinas das células gliais ao neurônio motor na ELA.....	8
Figura 2 -	O modelo <i>dying-back</i> da degeneração do neurônio motor na ELA.....	11
Figura 3 -	Posição anatômica do nervo extensor curto do hálux. Adaptado e traduzido de http://pixshark.com/extensor-hallucis-brevis.htm	31
Figura 4 -	Nervo extensor curto do hálux antes e após a retirada durante biópsia realizada em pacientes acompanhados no Ambulatório de ELA do Departamento de Neurologia do HC/FMUSP.	31
Figura 5 -	Rede de co-expressão entre pacientes ELA comparados com controles .	71
Figura 6 -	Rede de co-expressão entre pacientes ELA forma espinal comparados com pacientes ELA forma bulbar	72
Figura 7 -	Gráfico da dispersão dos 30 genes que apresentaram os maiores valores de <i>Degree</i> e <i>Betweenness</i> , fornecida pelo programa Cytoscape, segundo a rede de co-expressão comparando ELA <i>versus</i> controles.....	73
Figura 8 -	Gráfico da dispersão dos 30 genes que apresentaram os maiores valores de <i>Degree</i> e <i>Betweenness</i> segundo a rede de co-expressão comparando ELA espinal <i>versus</i> ELA bulbar	74
Figura 9 -	Gráficos dos resultados de qPCR, em <i>Fold</i> relativo, dos genes avaliados nos nervos motores dos indivíduos-controle (CTR), pacientes com esclerose lateral amiotrófica, casos bulbares (B) e espinais/não bulbares (NB)	75

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Distribuição de casos de ELA familiar na amostra de 448 indivíduos55
- Gráfico 2** – Variação da idade de aparecimento do primeiro sintoma de acordo com o subtipo de ELA56
- Gráfico 3** – Distribuição do subtipo de ELA de acordo com o sexo.....56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Genética da ELA familiar	4
Quadro 2 -	Informações dos Pacientes biopsiados	29
Quadro 3 -	Relação dos sujeitos-controle	30
Quadro 4 -	Pacientes atendidos no ambulatório ELA do HC-FMUSP no período de abril de 2011 até abril de 2016.....	41
Quadro 5 -	Relação dos pacientes submetidos à biópsia do nervo extensor curto do hálux para análise de <i>Microarray</i>	57
Quadro 6 -	Genes com a expressão desregulada específica para cada grupo estudado	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sequências dos oligonucleotídeos que foram utilizados nos experimentos de qPCR e seus respectivos tamanhos de amplificadores (pares de bases, pb).	36
Tabela 2 -	Características descritivas dos 448 participantes do estudo, de acordo com o diagnóstico do subtipo de ELA, abril/2011-abril/2016.....	57
Tabela 3 -	Comparação das características descritivas dentre os 14 participantes com biópsia e os 434 participantes sem biópsia, abril/2011-abril/2016..	58
Tabela 4 -	Lista de genes diferencialmente expressos obtidos a partir de análises de <i>microarray</i> de nervos motores de pacientes com ELA, casos bulbares (B) e espinhais (E), e indivíduos-controle (CT).	59
Tabela 5 -	Vias super-representadas para os genes diferencialmente nas análises de pacientes com ELA comparados com os controles e na análise específica comparando os casos de pacientes com ELA espinhais com bulbares.	65
Tabela 6 -	Processos biológicos super-representados pelas análises da plataforma DAVID do nervo de pacientes com ELA comparados com os controles.	66
Tabela 7 -	Componentes celulares super-representados pelas análises da plataforma DAVID do nervo de pacientes com ELA comparados com os controles.	67
Tabela 8 -	Funções moleculares super-representadas pelas análises da plataforma DAVID do nervo de pacientes com ELA comparados com os controles.	67
Tabela 9 -	Processos biológicos super-representados pelas análises da plataforma DAVID do nervo de pacientes com ELA espinhal comparados com os casos de ELA bulbar.	68
Tabela 10 -	Componentes celulares apresentados como super-representados pelas análises da plataforma DAVID do nervo de pacientes com ELA espinhal comparados com os casos bulbar.	69
Tabela 11 -	Funções moleculares apresentados como super-representados pelas análises da plataforma DAVID do nervo de pacientes com ELA espinhal comparados com os casos de ELA bulbar.	70

RESUMO

Jorge FMH. *Correlação clínico-molecular na Esclerose Lateral Amiotrófica fundamentada pelos achados da expressão gênica no nervo extensor curto do hálux* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa progressiva e incurável, caracterizada pela perda seletiva dos neurônios motores (NM) superiores e inferiores com uma sobrevida média de 3 anos. As manifestações clínicas dependem da topografia e comprometimento dos NM. De causa desconhecida, descrições apontam para a participação das células gliais (astrócitos, microglia e célula de Schwann) na toxicidade neuronal. A retração precoce do axônio no músculo esquelético sugere a participação da célula de Schwann na morte neuronal retrógrada (*dying back*). Este estudo descreveu as alterações na expressão gênica no nervo motor extensor curto do hálux ainda funcional dos pacientes ELA e o ramo motor do nervo acessório de sujeitos-controle (19 ELA, sendo 9 ELA espinhal e 5 ELA bulbar; 5 controles), utilizando-se plataformas expandidas de microarranjos de DNA (*microarray*) e análises de bioinformática (DAVID e os seus bancos de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* e o *Gene Ontology Consortium Annotation*). Os resultados foram validados por PCRq e Redes de Interação de Proteínas foram geradas pelo Cytoscape. Foram encontrados 138 genes diferencialmente expressos entre esses grupos. O ribossomo e a síntese proteica foram apontados como elementos centrais no estudo em eventos relacionados tanto à neurotoxicidade quanto a protetivos. As Redes destacaram o gene EPS8 na ELA (ambas as formas, ELA bulbar e espinhal) em relação aos controles e o gene FAU na ELA bulbar em relação à ELA espinhal. Os genes e as vias apontados neste estudo deverão ser testados como alvos terapêuticos em estudos futuros envolvendo a ELA.

Descritores: Esclerose Lateral Amiotrófica; Células de Schwann; Neurônio Motor; Neurodegeneração; Biologia Molecular.

ABSTRACT

Jorge FMH. *Clinical-molecular correlation in Amyotrophic Lateral Sclerosis based on gene expression findings of the extensor hallucis brevis nerve*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an incurable progressive neurodegenerative disease characterized by the selective loss of upper and lower motor neurons (MN), with a median survival of 3 years. Clinical manifestations depend on onset site and involvement of the MN. Although the cause of ALS is unknown, reports point towards the participation of glial cells (astrocytes, microglia and Schwann cells) in the neuronal toxicity. The early retraction of the axonium indicates a participation of the Schwann cells in retrograde neuronal death (dying back). The current study described the abnormalities in the genic expression of the functioning extensor hallucis brevis motor neuron from ALS subjects, and the motor branch of the accessory nerve from control subjects (19 ALS, being 9 spinal and 5 bulbar types; 5 controls), through an expanded platform of DNA *microarrays* and bioinformatics analyses (DAVID, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, and Gene Ontology Consortium Annotation databases). The results were validated by Quantitative PCR (PCRq) and Protein-Protein interaction network generated by Cytoscape. A total of 138 differentially expressed genes were found in these groups. In this study, the ribosome and protein synthesis were pointed as central elements related both to neurotoxicity and protective events. These networks highlighted the EPS8 gene in ALS (in both types, bulbar and spinal) when correlated to controls, and the FAU gene in bulbar ALS in relation to spinal ALS. The genes and pathways identified in this study should be tested as therapeutic targets in future studies approaching ALS.

Descriptors: Amyotrophic Lateral Sclerosis; Schwann Cells; Motor Neuron; Neurodegeneration; Molecular Biology.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Esclerose Lateral Amiotrófica

As doenças do neurônio motor (DNM) são enfermidades neurodegenerativas e progressivas com diferentes etiologias e espectros clínicos, mas com um evento final comum, a morte dos neurônios motores (NM) inferiores e/ou superiores¹.

A Esclerose lateral amiotrófica (ELA) é a DNM mais frequente, bem como, a mais estudada dentre elas, sendo caracterizada pela perda seletiva dos neurônios motores superiores e inferiores. A doença apresenta evolução clínica rápida e progressiva, sem tratamento específico, os doentes apresentam sobrevida média de 3 anos². Atualmente, descreve-se sua incidência e prevalência mundiais, as quais variam de 0,46 a 2,39 e 2,01 a 11,3 por cem mil habitantes, respectivamente³. Por razões desconhecidas, atinge, ligeiramente, mais o sexo masculino, com proporção masculino:feminino de 1,5:1. A idade média habitual de aparecimento da doença ocorre entre os 55-65 anos de idade, embora, em alguns casos, cerca de 5% possa manifestar-se a partir da segunda década de vida⁴.

A ELA foi, primeiramente, descrita por Charcot em 1869, sendo a principal característica neuropatológica da ELA a perda extensiva dos NM inferiores no corno anterior da medula espinhal e no tronco encefálico, degenerações do trato corticoespinhal e dos neurônios piramidais no córtex motor primário que projetam seus axônios aos motoneurônios inferiores⁵. Gliose reativa em torno das áreas de neurodegeneração é achado histopatológico pós-mortem ou de neuroimagem⁶. A causa da doença é desconhecida na grande maioria da assim chamada forma esporádica da ELA. Nos casos com história familiar da doença que atingem cerca de 5-10% dos pacientes³, são apontadas como fatores de risco da ELA várias mutações genéticas^{7,8} (resumidas no Quadro 1). Mesmo nestes casos da ELA familiar com mutações gênicas caracterizadas, os mecanismos celulares e moleculares relacionados à morte dos neurônios motores ainda não estão totalmente elucidados.

Quadro 1 - Genética da ELA familiar

Subtipo Genético	Locus Cromossomo	Gene	Proteína	Herança	Características Clínicas
ELA1	21q22.1	SOD1	Cu/Zn SOD-1	AD/AR	ELA típica
ELA2	2q33-2q35	Alsin	Alsin	AR	Progressão lenta e predomínio NMS
ELA3	18q21	Desconhecido	Desconhecido	AD	ELA típica com início MI
ELA4	9q34	SETX	Senataxin	AD	Progressão lenta
ELA5	15q15-21	SPG11	Spataesin	AR	Progressão lenta
ELA6	16p11.2	FUS	Fused in Sarcoma	AD/AR	ELA típica
ELA8	20q13.3	VAPB	VAPB	AD	Predomínio NMI e temores
ELA9	14q11.2	ANG	Angiogenin	AD	ELA + DFT + Parkinsonismo
ELA10	1p36.2	TARDBP	DNA-binding protein	AD	ELA típica
ELA11	6q21	FIG4	Phosphoinositide-5phosphatease	AD	Progressão rápida e predomínio NMS
ELA12	10p13	OPTN	Optineurin	AD/AR	Progressão lenta e predomínio NMS
ELA14	9p13.3	VCP	VCP	AD	ELA típica podendo ter DFT
ELA15/ELAX	Xp11	UBQLN2	Ubiquilin 2	XD	Início NMS
ELA16	9p13.2-21.3	SIGMAR1	SIGMAR1	AR	Início juvenil
ELA-DFT1	9q21-22	Desconhecido	Desconhecido	AD	ELA + DFT
Ela-DFT2	9p21	C9ORF72	C9ORF72	AD	ELA + DFT

Característica comum da ELA com outras doenças neurodegenerativas é a formação de agregados proteicos nos neurônios em degeneração⁹. Embora a composição dessas estruturas proteicas permaneça, em parte, desconhecida, os agregados compreendem, predominantemente, as inclusões citoplasmáticas neuronais de proteínas do processamento do RNA nuclear, a chamada TDP-43 (*TAR-DNA Binding Protein 43*) em muitos dos casos de ELA¹⁰.

A ELA apresenta um elevado impacto socioeconômico atrelado à sua alta morbidade e mortalidade, com custos diretos e indiretos elevados devidos à perda de produtividade do paciente, à necessidade de assistência para as atividades de vida diária,

aposentadorias precoces por incapacidade, impacto na estrutura familiar, medicamentos, internações hospitalares para as constantes intercorrências clínicas, e cuidados com as complicações físicas e emocionais¹¹. Schepelmann e colaboradores mostraram que a ELA chega a custar quase três vezes mais por paciente ao ano que a miastenia gravis, outra doença neuromuscular com prevalência semelhante na população mundial¹².

As manifestações clínicas da ELA correspondem-se aos achados dos acometimentos dos neurônios motores superiores e inferiores nas diversas regiões do corpo humano, levando à miscelânea fenotípica que caracteriza a doença, mas que dificulta e retarda o seu diagnóstico. Assim, a ELA é mais comumente dividida pelo local de início da doença. ELA bulbar, responsável por cerca de 25% dos casos, caracteriza-se quando os sintomas iniciais localizam-se no segmento cefálico acometendo regiões relacionadas com a respiração, fala e deglutição³; a ELA espinhal, por sua vez, aparece em cerca de 75% dos casos, e caracteriza-se quando se inicia pela musculatura inervada pelos neurônios motores espinhais, e sintomas de fraqueza tanto distal como proximal nos membros superiores e/ou inferiores¹³.

A combinação especial de acometimento variáveis e progressivos dos NM superiores e inferiores culminam sinais físicos que caracterizam a doença¹⁴. A perda de NM superiores afetam a unidade motora que reduz a taxa de disparo e recrutamento dos NM inferiores, levando a uma desaceleração da velocidade de contração, movimentos repetitivos mais lentos, fraqueza, e diminuição da ativação muscular, bem como, hiperreflexia e espasticidade¹⁵. Adicionalmente, o comprometimento de NM inferiores resulta na perda de unidades motoras levando à atrofia muscular, a fasciculações, à hiporreflexia e à perda considerável de tônus e força^{16,17}. Nem todas as unidades motoras são igualmente vulneráveis durante o progresso da doença. Análises eletroneuromiográficas de pacientes com ELA revelam claramente que as maiores e mais fortes unidades motoras são mais afetadas pela doença¹⁸. Além disso, estudos histopatológicos também descreveram uma degeneração preferencial dos maiores NM na ELA¹⁹.

Nos estágios iniciais da doença, a variação de padrão do envolvimento dos NM inferiores e superiores com fraqueza muscular assimétrica pouco específica podem tornar o diagnóstico de ELA um desafio. De fato, um dos principais problemas na ELA é o atraso no diagnóstico, uma vez que os sintomas iniciais podem ser semelhantes a outras doenças da medula espinal, neuropatias e síndromes neurológicas²⁰. A

necessidade do diagnóstico precoce cresceu com o advento de possíveis novas terapias para a ELA; porque é intuitivamente provável que a terapia precoce irá produzir melhores resultados.

Muitos esforços são feitos no desenvolvimento de biomarcadores bioquímicos e de imagem específicos capazes de antecipar o diagnóstico²¹. Até o momento, porém, os critérios de diagnóstico se baseiam em achados clínicos e em estudos eletrofisiológicos, estabelecidos com base na presença e distribuição de envolvimento dos neurônios motores inferiores e superiores²². Do mesmo modo, a avaliação clínica, os parâmetros respiratórios avaliados nas provas de funções pulmonares e os testes eletrofisiológicos são os mais utilizados no monitoramento da progressão da ELA.

Como mencionado acima, os estudos neurofisiológicos de condução nervosa auxiliam no diagnóstico da ELA, uma vez que permitem definir e excluir outras desordens musculares, de nervos periféricos ou da junção neuromuscular que podem imitar o fenótipo da doença²². A eletroneuromiografia (ENMG) fornece evidências de disfunção do NM inferior, que corroboram no diagnóstico da ELA²³.

Os critérios diagnósticos mais utilizados atualmente são El Escorial Revisado (Brooks, 2000)²² e Awaji (Mamede, 2008)²⁴. O El Escorial estadia nas seguintes categorias: ELA clinicamente definida (com sinais de NM superior e NM inferior em três regiões ou sinais de NM superior e NM inferior, na região bulbar e, pelo menos, duas regiões espinais); ELA clinicamente provável (sinais clínicos de NM superior e NM inferior em, pelo menos, duas regiões com alguns sinais de NM superior necessariamente rostrais aos sinais de NM inferior); ELA clinicamente provável com suporte laboratorial (sinais clínicos de NM superior e NM inferior estão em apenas uma região ou sinais clínicos apenas de NM superior em uma região e sinais de NM inferior definidos pela ENMG presentes em, pelo menos, duas regiões, e com exames de neuroimagem e clínico-laboratoriais que excluam outras causas); ELA clinicamente possível (sinais clínicos de NM superior e NM inferior juntos em apenas uma região ou sinais clínicos apenas de NM superior em duas regiões). O critério de Awaji utiliza as mesmas categorias e sua diferença em relação ao El Escorial dá-se por definir que os achados de sinais de acometimento dos NM inferiores na ENMG têm o mesmo valor dos sinais clínicos, o que aumenta a sensibilidade diagnóstica. Porém, os ensaios clínicos ainda utilizam mais os critérios de El Escorial Revisado.

A despeito do grande número de ensaios clínicos que estão em execução, ainda não há tratamento efetivo disponível para ELA. Foi somente nos anos 90 que a primeira droga foi aprovada para o tratamento de pacientes com ELA. O riluzole é mundialmente prescrito, um agente antilutamatérgico que bloqueia a liberação presináptica do glutamato, mas a sua eficiência é questionável, com benefício terapêutico aparente mínimo de cerca de 3-4 meses de aumento da sobrevivência e sem efeito algum nos parâmetros clínicos da doença²⁵.

A grande restrição ao desenvolvimento de novas terapias na ELA é a dificuldade de traduzir os resultados dos testes experimentais positivos em tratamentos de sucesso na prática clínica^{26,27}. Deste modo, busca-se, hoje, o desenvolvimento e a aplicação de novas metodologias capazes de proporcionar resultados pré-clínicos mais alinhados com as tomadas de decisões clínicas. Uma vez que a fisiopatologia da ELA não é completamente compreendida, é possível que as formas familiar e esporádica da doença diferem em alguns aspectos biológicos fundamentais que determinam a eficácia generalizada de um determinado tratamento. Até o momento, os modelos animais e *in vitro* para o estudo da ELA mostram-se limitados na expressão plena da doença humana, portanto, aumentando, assim, a importância do desenvolvimento e da aplicação de técnicas que levam a resultados pré-clínicos aplicáveis à prática clínica.

As vias moleculares que causam a degeneração do NM na ELA são pouco conhecidas. À luz do que já foi descrito para outras doenças neurodegenerativas, é provável que ocorra uma interação complexa entre vários mecanismos celulares e moleculares na patogenia da ELA^{7,28,29}. Dentre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na morte do NM na ELA, incluem-se o estresse oxidativo, a disfunção mitocondrial, o comprometimento do transporte axonal, a excitotoxicidade, a agregação de proteínas mal-formadas, o estresse do retículo endoplasmático, o processamento de RNA anormal, a neuroinflamação, o papel dos músculos-alvo e junção neuromuscular e, finalmente, o papel das células não neuronais (células de Schwann, astrócitos)¹¹, como exemplificado na Figura 1.

Figura 1 - Esquema ilustrando os principais mecanismos descritos para as ações autócrinas e parácrinas das células gliais ao neurônio motor na ELA

(A) Excitotoxicidade resultante da deficiência na remoção do glutamato das sinapses em virtude da alteração na expressão/atividade do transportador de glutamato EAAT2 em astrócitos. (B) Estresse no retículo endoplasmático induzido por interações anormais entre SOD1 mutada e proteínas. (C) Inibição do proteossomo decorrente de super-estimulação da via de degradação proteossômica com agregados proteicos ubiquitinados. (D) Disfunção mitocondrial mediada pela deposição de SOD1 mutada na membrana da mitocôndria provocando liberação do citocromo C em neurônio e estresse oxidativo nos astrócitos. (E) Secreção de SOD1 mutada para o meio extracelular pelos neurônios motores e astrócitos. (F) Produção de radicais livres pelas células gliais. (G) Transporte axonal alterado. (H) neurônios motores apresentam desregulação transcripcional e processamento anormal de RNS. (I) Autofagia em decorrência de defeitos no proteossomo e estresse do retículo endoplasmático. (J) Déficit no metabolismo energético pela diminuição no aporte de lactato pelos oligodendrócitos. (K) Suporte trófico mediado pelas células de Schwann.

Adaptado e traduzido de Ilieva e colaboradores (2009)³⁰.

1.2 Células gliais e a patogênese da ELA

Evidências apoiam a hipótese da participação da axonopatia distal na ELA, na qual alterações patológicas ocorrem na junção neuromuscular e terminais axonais antes mesmo da morte dos neurônios motores. Alterações estruturais no músculo esquelético e o processo de retração axonal ocorrem precocemente nos modelos animais transgênicos^{31,32,33} e, também, já foram descritos em sujeitos com ELA esporádica^{34,35,36} e ELA familiar^{37,38}.

Embora a paralisia progressiva na ELA surja do processo de retração axonal e degeneração e morte do NM, evidências recentes apontam para a toxicidade parácrina,

ou seja, aquela nos neurônios motores induzidos por outros tipos celulares próximos a eles. Esta toxicidade parácrina parece ser a responsável pela progressão rápida da doença. Ressalta-se, por exemplo, que, na ELA causada pelo gene da SOD1 mutada, esse expressa-se não apenas nos neurônios comprometidos, mas também na glia vizinha, células que se tornam reativas muito antes da morte do motoneurônio^{30,39}. De fato, o envolvimento de mais de um tipo celular (neurônios, astrócitos, microglia) é necessário para a evolução da doença no modelo animal da SOD1 mutante. No entanto, níveis mínimos de expressão da SOD1 mutada nos motoneurônios são necessários para iniciar a doença^{40,41}. Ainda, a construção de animais quiméricos mostrou que a presença de maior número de neurônios motores contendo mutações leva à maior precocidade do início da doença, mas não à degeneração e morte dos neurônios em idades compatíveis⁴². Boillée e colaboradores (2006), usando camundongos que carregam o gene mutado da SOD1 extirpável pela ação da cre-recombinase, mostraram a contribuição diferencial do dano promovido pelo gene mutado no NM e nas células não neuronais vizinhas no início e na progressão da doença⁴³. Deste modo, parece que a presença da mutação na linhagem macrofágica/microglial acelera a progressão, enquanto que a presença da mutação no NM influencia o início da doença. Ressalta-se que a presença da mutação na linhagem microglial *per se* não é suficiente para promover a morte do neurônio.

1.3 A célula de Schwann e a desnervação periférica na ELA

Além da ativação astrocitária e microglial observada na medula espinhal de pacientes e animais transgênicos na fase pré-sintomática da ELA, a retração dos terminais do axônio motor e a desnervação das junções neuromusculares são outros eventos precoces na doença^{44,45}. Achados de Gould e colaboradores (2006) suportam a ideia de que a desnervação periférica é o evento inicial predominante na ELA⁴⁶. No entanto, não é totalmente conhecido até o momento o papel dos elementos periféricos (fibra muscular e células de Schwann) na fisiopatologia da ELA.

A participação das células de Schwann na fisiopatologia da ELA deve-se às interações com os neurônios motores e à junção neuromuscular por meio da ação de regular a estabilidade morfológica, integridade e reparação desses. As células de Schwann estão presentes na reinervação e no remodelamento sináptico, e podem atuar

como mecanismos compensatórios ou mesmo como componente primário da própria patologia^{47,48,49}, ou seja, pode haver mecanismos tóxicos ou protetores frente ao curso da neurodegeneração. A determinação do papel das células Schwann durante a progressão da doença é dificultada pela complexidade das interações que ocorrem entre as células não neuronais e os neurônios motores.

Estudo recente demonstrou que a doença em camundongos transgênicos SOD1^{G93A} é iniciada simultaneamente na medula espinhal e nos nervos periféricos, ocorrendo ao redor de 25 a 30 dias de idade, período no qual os camundongos ainda são assintomáticos⁵⁰. Além disso, ocorrem durante a progressão da doença episódios de aumento na expressão de GFAP, molécula que se comporta como um marcador de injúria nas células de Schwann⁵¹.

Fischer e colaboradores (2004) mostraram que um dos primeiros fenótipos celulares da doença é a perda das junções neuromusculares, ocorrendo por volta dos 47 dias de vida em camundongos SOD1^{G93A}, sugerindo que a ELA pode ter elementos de toxicidade periférica com morte neuronal retrógrada. Taxa de 80% de desnervação das junções neuromusculares foi encontrada em camundongos SOD1^{G93A} no momento do aparecimento dos déficits motores⁵². Estes resultados enfatizam que os elementos periféricos exercem papel relevante nos estágios pré-sintomáticos da doença.

A reinervação e o remodelamento sináptico nas doenças do NM podem ser devidos a mecanismos compensatórios ou mesmo como componente primário da própria patologia. A reinervação das placas neuromusculares depende das células de Schwann terminais, células estas localizadas próximas à junção neuromuscular, estenderem seus prolongamentos. Este mecanismo neuroplástico periférico é indispensável à orientação das fibras nervosas em crescimento, evento que se mostra alterado na ELA⁵³. No nível molecular, o quimiorrepelente dos cones de crescimento, a semaforina 3A, é expressa seletivamente nas células de Schwann nas junções neuromusculares das fibras musculares fatigáveis rápidas, após a indução de uma lesão do nervo, evento este também encontrado na ELA antes do período de morte dos NM⁵³. Desta forma, a célula de Schwann terminal das fibras musculares fatigáveis rápidas pode não somente restringir a plasticidade destas após a desnervação, mas também influenciar negativamente a integridade da junção neuromuscular⁵⁴.

A Figura 2 sumariza os principais mecanismos propostos acerca da influência das células periféricas, célula de Schwann e músculo, em contato com o axônio motor,

capazes de, potencialmente, promover a morte neuronal retrógrada. Esta hipótese é conhecida na literatura científica mundial como *dying-back*⁵⁵.

Figura 2 - O modelo *dying-back* da degeneração do neurônio motor na ELA

A retração dos axônios motores é um evento precoce que ocorre já na fase pré-sintomática da ELA e tem sido proposto como causa primária da morte neuronal. Diferentes mecanismos são propostos para explicar esse fenômeno. Danos no transporte axonal podem afetar o suprimento de componentes necessários para a manutenção da junção neuromuscular. Danos mitocondriais podem reduzir a quantidade de ATP disponível na sinapse distal e acarretar danos metabólicos, aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e prejudicar o tamponamento de cálcio pela mitocôndria. O desmantelamento das junções neuromusculares e a retração axonal já foram relacionados com alterações nas proteínas de guiamento axonal, tais como Semaforina 3A (SEMA3A) e NOGO-A, nas células de Schwann do modelo animal de ELA. O papel da imunidade inata e a ativação do complemento no processo de morte neuronal retrógrada também têm sido propostos. Todos esses eventos podem ser desencadeados por degeneração das células musculares, alterações axonais, e comprometimento do suporte trófico e mecânico oferecido pelas células de Schwann. A consequência de degeneração das sinapses distais é a inevitável morte dos neurônios motores.

Adaptado e traduzido de Cozzolino et al., 2012⁵⁵.

Evidência adicional foi descrita no estudo de Schaefer, que utilizou camundongos transgênicos SOD1^{G93A} e deficientes para proteína pró-apoptótica BAX. Os animais apresentavam desnervação neuromuscular e vacuolização mitocondrial sem a ocorrência de morte neuronal. A desnervação precede o depósito da SOD1 mutada nos neurônios motores e a astrogliose na medula espinhal⁴⁶. Ressalta-se que os acúmulos de SOD1 mutada ocorrem também nas células de Schwann distais antes da retração dos terminais axonais⁴², o que reafirma o papel desta célula glial periférica na fisiopatologia da ELA.

As primeiras evidências da participação das células de Schwann na ELA advieram das descrições histopatológicas que demonstraram o aumento do número destas nas

fibras não mielínicas do nervo sural (um nervo sensitivo) de pacientes mantidos em cuidados suplementares de respiração artificial⁵⁶. De fato, neuropatologistas holandeses já postularam que a ELA não é uma doença puramente motora ao constatarem a expressão aumentada do receptor do fator de crescimento do nervo (NGF), possivelmente do tipo p75, associado à morte celular, nas células de Schwann anexas às fibras nervosas degeneradas em nervos mistos, em raízes motoras e em menor extensão nas raízes sensitivas⁵⁷. A reexpressão do receptor p75 está implicada na injúria e na neurodegeneração do sistema nervoso, correlacionando-se com a progressão da ELA no modelo animal^{58,59}.

A dependência do NM por seu alvo muscular de inervação ocorre até curto período após o nascimento, a partir do qual mecanismos tróficos autócrinos (fornecidos pelo próprio neurônio) e parácrinos (fornecidos pelas células gliais vizinhas ao neurônio) passam a vigorar⁶⁰. O possível comprometimento da sinalização trófica pelas células de Schwann na evolução da ELA é corroborado pela maior sobrevida dos camundongos transgênicos que receberam injeções periféricas de fatores neurotróficos ou de genes destes fatores produzidos/expressos pelas células de Schwann, a despeito das já confirmadas alterações do transporte axonal retrógrado pelos axônios motores⁶¹.

A tese de doutorado de Chrystian Junqueira Alves, de 2015, demonstrou a influência negativa das Células de Schwann do modelo experimental na fase pré-sintomática e do paciente com evolução recente da ELA esporádica na sobrevida e no tamanho dos prolongamentos dos NM *in vitro*. Essa conclusão foi obtida a partir de experimentos utilizando sistemas de co-cultura e tratamento dos NM com o meio condicionado das Células de Schwann. A dosagem de moléculas no meio condicionado das culturas revelou falência neurotrófica nas Células de Schwann ELA, e a análise pelo qPCR mostrou diversas alterações moleculares nas Células de Schwann dos camundongos e no nervo periférico dos pacientes com ELA. O autor demonstrou, assim, a influência na neurodegeneração em co-cultura das células de Schwann dos pacientes com ELA em comparação com as células de Schwann dos sujeitos-controle saudáveis⁶².

De fato, a sinalização trófica das células de Schwann às fibras neuronais periféricas é bidirecional, de modo que, mesmo se a causa da retração axonal é outra que não aquela mediada diretamente pelas células de Schwann, alterações na sinalização

trófica destas células podem contribuir para a falência da reinervação e a rápida progressão da doença.

Em síntese, as alterações patológicas do sistema nervoso periférico são achados importantes nas pesquisas atuais envolvendo as doenças do NM. Apesar da fisiopatologia da degeneração axoneuronal na ELA ser pouco compreendida, há fortes indícios da participação das células de Schwann nesse processo e os mecanismos moleculares envolvidos precisam ser esclarecidos. Perguntas a serem respondidas incluem, por exemplo, quais são, de fato, os fatores promotores da toxicidade, qual a sinalização celular envolvida e como este conhecimento pode contribuir para novas abordagens terapêuticas.

1.4 A expressão gênica na ELA

A expressão gênica é o processo pelo qual a informação do gene forma o produto final que, geralmente, é a síntese proteica. A regulação gênica dá à célula controle sobre sua estrutura e função, e é a base para a diferenciação celular, para a morfogênese, e para a versatilidade e adaptabilidade de qualquer organismo⁶³.

O comportamento do organismo nas situações de doenças crônicas pode ser analisado por meio da expressão dos seus genes. Eventos relacionados ao dano celular e à modulação protetora coexistente podem ser estudados ao nível molecular pela avaliação da expressão gênica. Tecnicamente, identifica-se e quantifica-se a expressão gênica dos genes e, em seguida, fazem-se as interpretações por meio de análises de bioinformática utilizando-se plataformas e bancos de dados com informações coletadas sobre as funções dos genes com atividade desregulada na doença⁴⁴.

Os microarranjos de DNA, também conhecido como *microarray*, correspondem à ferramenta laboratorial utilizada na detecção da expressão de milhares de genes. Na técnica do *microarray*, empregam-se lâminas de microscópio que carregam impressos de milhares de sequências específicas de DNA que são referidos como chips de DNA. As moléculas de DNA impressas nas lâminas atuam como sondas na detecção da regulação dos genes. Na prática, o resultado final é conhecido como transcriptoma⁶⁴. O transcriptoma de um organismo representa todo o repertório de transcrições codificadas pelos genes como uma resposta fenotípica à condição em que eles existem⁶⁵.

Nas análises do *microarray*, as moléculas de RNAm são coletadas da amostra experimental da amostra de referência. A amostra de referência pode ser coletada do indivíduo saudável e a amostra experimental do indivíduo com a doença. As duas amostras de RNAm são, então, convertidas em DNA complementar (DNAC), e cada amostra é marcada com uma sonda fluorescente de uma cor diferente. Assim, a amostra experimental de DNAC pode ser marcada com um corante fluorescente vermelho, enquanto que o DNAC de referência pode ser marcado com um corante fluorescente verde. As duas amostras são, então, misturadas e permitem-se ligar às sequências expressas nas lâminas do *microarray*. Após a hibridação das moléculas de DNAC às sondas de DNA, as lâminas são lidas por escaneamento de cada gene e os resultados são expressos em valores numéricos⁶⁶. As desregulações, ou seja, a regulação aumentada ou diminuída, são feitas pelas comparações acima. A tecnologia do *microarray* é capaz de examinar a expressão de centenas ou milhares de genes simultaneamente, o que revoluciona as análises em biologia molecular⁶⁷.

O método validado pela tecnologia da reação da polimerase em cadeia em tempo real (PCRq) é uma abordagem precisa e reprodutível para a quantificação de genes em escala menor^{68,69}.

DAVID (do Inglês: *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) é a ferramenta utilizada na análise funcional dos resultados do *microarray*⁷⁰. Entre os principais bancos de dados em que o DAVID se baseia, estão o *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) e o *Gene Ontology Consortium Annotation* (GOCA)⁷⁰.

O GOCA permite organizar os genes por processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares⁷¹. O KEGG é a base de dados que integra as informações funcionais genômica, química e sistêmica, oferecendo a vantagem de ser fundamentada no conhecimento das interações moleculares e das redes de reação para metabolismo, processamento de informação genética, processos celulares, doenças humanas e desenvolvimento de fármacos⁷².

A análise funcional dos resultados da expressão gênica é feita pela construção de redes de interação dos genes desregulados e da inserção de genes co-expressos. A análise de redes de co-expressão ganha importância crescente nos estudos de sistemas complexos em diversos domínios⁷². Estas redes ilustram as relações complexas entre genes individuais ou vias moleculares, relacionando-os de acordo com seus perfis de

expressão⁷³ e organizando estes em módulos representativos de suas interações⁷². Medidas de centralidade topológica computadas para estes modelos de redes, como graus de centralidade, são usadas para identificar alvos, uma vez que componentes com maior grau de centralidade são apontados como fundamentais na propagação e modulação de influências funcionais⁷².

Esta tese visa detalhar os possíveis efeitos tóxicos ou protetores das células de Schwann sobre os neurônios motores, estudando as alterações moleculares no nível da expressão gênica no nervo extensor curto do hálux obtido de biópsias de sujeitos com a forma esporádica da ELA e comparadas aos resultados obtidos de fragmentos cirúrgicos de nervo motor utilizados nas transposições nervosas quando do reparo cirúrgico de lesões traumáticas do plexo braquial de sujeitos desprovidos de doenças sistêmicas relacionadas às neuropatias periféricas. As alterações moleculares foram estudadas por meio da tecnologia descrita acima.

2 JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

A ELA é uma doença neurodegenerativa de progressão rápida que acomete os NM inferiores e superiores em indivíduos adultos, muitas vezes, jovens, em idade produtiva. A incapacidade motora progressiva culmina com paralisia dos músculos respiratórios e consequente morte relacionada. As abordagens terapêuticas disponíveis ainda não são capazes de alterar o curso da doença.

Há indicativos do envolvimento das células de Schwann na fisiopatologia da ELA. A caracterização das vias de sinalização moleculares nessas células podem identificar novos alvos terapêuticos na ELA.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações moleculares no nervo motor do paciente em função da apresentação clínica da forma esporádica da ELA.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Elaboração do banco de dados Informatizado para registro e análise dos detalhes clínicos dos pacientes com ELA acompanhados no Ambulatório de ELA do HC-FMUSP.

3.2.2 Utilizar *microarrays* de DNA e técnicas de bioinformática para analisar o perfil de expressão gênica no nervo motor, nervo extensor curto do hálux ainda funcionando, de doentes com ELA, formas bulbar e espinhal, e comparar com os sujeitos-controle.

3.2.3 Eleição de genes para validação pela técnica do PCR em tempo real e análises detalhadas da participação deles como alvos terapêuticos possíveis na ELA.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

O presente projeto foi aprovado pela Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Faculdade de Medicina do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (CAPPESQ, nº 0187/11) (Anexo B).

As técnicas aqui descritas fazem parte da rotina do LIM-457^{75,76,77,78,79}.

4.1 Diagnóstico

O diagnóstico de ELA é feito com base na presença de sinais de comprometimento do NM superior e inferior concomitantes em diferentes regiões com progressão e ausência de evidências (ENMG, neuroimagem) que possam justificar os sinais e sintomas por outra causa. Foi utilizado o critério de El Escorial Revisados²² neste estudo.

4.2 Registro da evolução dos parâmetros clínicos no banco de dados

O registro da evolução dos parâmetros no banco de dados deu-se por meio de consultas periódicas a cada três a seis meses dos pacientes no Ambulatório de ELA do HCFMUSP, com a avaliação clínica e quantificação da força muscular; tônus, volume, reflexos e existência de fasciculações nos membros superiores tanto proximais quanto distais, nos membros inferiores proximais e distais, e no segmento cefálico. Para isto, foi desenvolvido e criado um Banco de Dados Informatizado para registro dos detalhes clínicos dos pacientes (Anexo E). Foi realizada, também, a escala de avaliação funcional para esclerose lateral amiotrófica⁸⁰ (ALSFR-S) para quantificação da evolução clínica dos pacientes (Anexo A).

4.3 Critérios de inclusão, não inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão para a biópsia foram os pacientes com ELA definida ou provável segundo os critérios do El Escorial²² e com o segmento distal do membro inferior com a funcionalidade preservada, local em que foi realizada a biópsia, entende-se por funcionalidade preservada a existência de força grau três ou maior na extensão do hálux pela escala MRC⁸¹ (Anexo C). Os critérios de exclusão foram pacientes portadores de ELA familiar e/ou diabetes mellitus.

4.4 Pacientes e biópsias do nervo periférico

Foram utilizados neste estudo pacientes que acompanham no Ambulatório de ELA do HCFMUSP no período de abril de 2011 até abril de 2016.

A avaliação neurológica e seleção dos pacientes foram realizadas sob a supervisão do Prof. Dagoberto Callegaro, chefe do Ambulatório. Após explicar aos pacientes os detalhes da pesquisa e os benefícios do procedimento para o estudo, os riscos do procedimento bem como a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo D) houve 22 pacientes que preencheram os critérios de inclusão, aceitaram e quiseram participar do projeto, sendo submetidos, assim, à biópsia do nervo extensor curto do hálux unilateralmente. Porém, um deles, ao ser submetido ao procedimento, não foi encontrado o nervo na topografia esperada, isto considerado como variação anatômica e, portanto, não houve biópsia nesse, 14 pacientes foram analisados por *microarray*, 7 para outros estudos de pesquisa (cultura de célula de Schwann, fibroblasto e *Fluorescence-activated cell sorting*) (Quadro 2). Foram utilizados, ainda, 5 sujeitos-controle previamente hígidos e sem diabetes que doaram fragmento cirúrgico de ramo motor do nervo acessório coletado durante a cirurgia de correção das lesões do plexo braquial (Quadro 3).

Uma vez que a ELA apresenta dois grandes fenótipos separados pelo sítio de início dos sintomas, ou seja, ELA de início bulbar quando os sintomas se iniciam e predominam no segmento cefálico, e ELA de início espinal quando os sintomas iniciam e predominam nos membros. Neste estudo, a título de simplificação, definiremos ELA bulbar e ELA espinal, respectivamente, para estes grupos. Assim, foi

feita análise comparando dois a dois cada um dos três grupos estudados: ELA bulbar x controles; ELA espinhal x controles e ELA espinhal x ELA bulbar.

Quadro 2 – Informações dos pacientes biopsiados

Pacientes	Gênero	Data da biópsia	Idade na biópsia (anos)	Fenótipo	Duração até a biópsia (meses)	Pesquisa de <i>Microarray</i>
ELA 1	Masculino	ago/11	47	Bulbar	28	Sim
ELA 2	Masculino	out/11	67	Bulbar	9	Não
ELA 3	Masculino	out/11	42	Espinal	102	Sim
ELA 4	Masculino	jan/12	60	Espinal	23	nervo não encontrado
ELA 5	Masculino	jan/12	42	Espinal	24	Sim
ELA 6	Feminino	fev/12	64	Espinal	25	Sim
ELA 7	Masculino	abr/12	55	Espinal	15	Sim
ELA 8	Masculino	abr/12	63	Espinal	62	Sim
ELA 9	Feminino	mai/12	57	Espinal	34	Sim
ELA 10	Masculino	ago/12	48	Espinal	13	Não
ELA 11	Masculino	nov/12	60	Espinal	34	Sim
ELA 12	Feminino	dez/12	58	Espinal	26	Sim
ELA 13	Feminino	fev/13	58	Bulbar	39	Sim
ELA 14	Feminino	mai/13	47	Espinal	25	Sim
ELA 15	Masculino	mai/13	66	Bulbar	32	Sim
ELA 16	Masculino	jun/13	58	Bulbar	25	Sim
ELA 17	Masculino	ago/13	60	Espinal	34	Não
ELA 18	Masculino	ago/13	68	Espinal	31	Não
ELA 19	Masculino	nov/13	46	Espinal	49	Não
ELA 20	Masculino	fev/14	34	Espinal	29	Não
ELA 21	Masculino	jun/14	58	Bulbar	30	Não
ELA 22	Feminino	dez/15	52	Bulbar	23	Sim

Os registros dos pacientes acima estão arquivados no ambulatório. Pela confidencialidade firmada, apresentaremos apenas nas necessidades justificadas.

Quadro 3 – Relação dos sujeitos-controle

Controles	Gênero	Data biópsia	Idade no momento da biópsia
CTL 1	Masculino	jan/13	41
CTL 2	Feminino	jan/13	30
CTL 3	Masculino	fev/13	25
CTL 4	Masculino	mar/13	35
CTL 5	Masculino	abr/13	29

Os registros dos pacientes acima estão arquivados no ambulatório.

Pela confidencialidade firmada, apresentaremos apenas nas necessidades justificadas.

Como o objetivo é a análise molecular interpretada pela expressão gênica, desenhou-se de tal maneira que o material analisado fosse proveniente de uma célula funcionante e não de um tecido já com morte celular, por isso foi definida a biópsia de segmentos com a funcionalidade preservada.

O nervo extensor curto do hálux é o ramo medial que é a continuação mais distal do nervo fibular profundo (Figura 3). Esse ramo medial (n. extensor curto do hálux) é responsável por parte da extensão do hálux e ocupa uma posição superficial no espaço entre o primeiro (hálux) e segundo pododáctilos. Pela posição e pelo músculo que inerva, a biópsia deste nervo é considerada pouco invasiva e leva a prejuízo funcional imperceptível ao paciente. A biópsia desse nervo foi realizada em condições assépticas no Centro Cirúrgico da Neurocirurgia Funcional do HCFMUSP pelo Dr. Roberto Sergio Martins, pesquisador do Grupo de Nervos Periféricos da Divisão de Neurocirurgia da FMUSP. Após a tricotomia da região dorsal do pé, cada paciente foi submetido à anestesia local (solução de xilocaína a 2%, sem vasoconstritor) e a incisão teve uma extensão de cerca de 5 cm a partir da junção entre o primeiro e segundo pododáctilos. Os diferentes planos teciduais foram dissecados para posterior isolamento e exérese de 2 cm do nervo extensor curto do hálux (Figura 4). O fragmento de nervo retirado foi, imediatamente, seccionado em duas partes; uma delas fixada em solução paraformaldeído 4% para análise de rotina do controle histopatológico das condições normais desse e a outra parte destinada à obtenção das células de Schwann em culturas, e experimentos de microarranjos de DNA e PCR em tempo real, e microdissecção a laser das células de Schwann e análise em tempo real.

Figura 3 - Posição anatômica do nervo extensor curto do hálux
Adaptado e traduzido de <http://pixshark.com/extensor-hallucis-brevis.htm>⁸²

Figura 4 - Nervo extensor curto do hálux antes e após a retirada durante biópsia realizada em pacientes acompanhados no Ambulatório de ELA do Departamento de Neurologia do HC/FMUSP

4.5 Experimento de *microarray* do nervo motor de pacientes com ELA

Com o intuito de identificar as sinalizações iniciais que poderiam ser responsáveis por desencadear a morte do NM, foram realizados experimentos de *microarray* utilizando o nervo extensor curto do hálux de pacientes com ELA e o ramo motor do nervo acessório de sujeitos-controle.

Para isso, o nervo motor dos pacientes com ELA e de seus respectivos controles foram submetidos à biópsia e congelados imediatamente em gelo seco para evitar degradação excessiva do RNA. O RNA total de cada nervo foi extraído utilizando-se o kit para extração de RNA (*RNeasy Lipid Tissue* – Qiagen). O ambiente de trabalho foi limpo utilizando-se solução descontaminante de RNase (Ambion). O RNA total dos nervos foi extraído de acordo com as recomendações do fabricante.

Os RNAs foram quantificados em NanoDrop1000 (Thermo) e tiveram sua qualidade acessada pelo *RNA6000 Pico Bioanalyzer* (Agilent). Apenas os RNAs com número de integridade (do Inglês, RIN) maior do que 5 foram utilizados nos experimentos.

Uma vez acessadas quantidade e integridade dos RNAs, foi dado início ao protocolo de *microarray* seguindo as recomendações do fabricante, descritas brevemente abaixo.

a) Desenho experimental

Para este estudo, foi utilizada a hibridação competitiva. Nesse caso, as hibridações foram realizadas utilizando uma amostra referência, comum a todas as hibridações, marcada com uma molécula fluorescente distinta das amostras experimentais. As amostras experimentais e referência foram misturadas e hibridadas em uma mesma lâmina. Como a hibridação foi competitiva, os valores de fluorescência obtidos revelaram níveis relativos de expressão de cada transcrito na amostra experimental comparada com a amostra referência, o uso da amostra referência possibilita comparações de experimentos independentes⁸³.

b) Preparação dos Spikes

Primeiramente, foram preparados os mixes dos spikes A e B por diluição seriada seguindo as instruções do fabricante para que se chegasse à solução de uso, determinada

pela concentração de RNA inicial. Os spikes são necessários para análises dos controles de qualidade das hibridizações e, consequentemente, dos resultados obtidos, uma vez que eles são marcados e hibridizados da mesma forma que as amostras.

c) Preparação da reação de marcação

Para as reações do *microarray*, foram utilizados 50ng do RNA total das amostras e 100ng total da referência. A referência foi composta pela mistura dos RNAs de culturas HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) e HEK 293 (*Human Embryonic Kidney 293 Cells*). Antes de prosseguir com a marcação, as amostras foram misturadas ao spike A pré-diluído e a referência foi misturada ao spike B pré-diluído. Após esta etapa, foi realizada a reação de transcrição reversa utilizando-se o primer promotor T7 (a se anelar na cauda poliA do RNA mensageiro), AffinityScript RNase Block mix e todos os constituintes básicos da reação de transcrição reversa, como dNTPs, o tampão da enzima e DTT. A reação foi incubada a 40°C durante 2 horas em termociclador, seguida da incubação a 70°C durante 15 minutos (este tempo de incubação é necessário para desnaturação das enzimas).

Após esta etapa, foi realizada a transcrição *in vitro* utilizando-se a enzima T7-RNA polimerase, NTPs, DTT e os fluoróforos cianina 3 (Cy3 - Amostras experimentais) ou cianina 5 (Cy5 - referência), para a realização da marcação das amostras. Esta reação foi incubada a 40°C durante 2 horas. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas utilizando-se o protocolo do Mini spin kit (GE) e quantificadas para eficiência de incorporação do fluoróforo em NanoDrop1000 (Thermo). Os valores obtidos foram submetidos a alguns cálculos matemáticos para avaliação da eficiência da incorporação do fluoróforo.

$$\text{I)} \quad \frac{(\text{Concentração de cRNA}) \times 30\mu\text{l (volume de eluição)}}{1000} = \mu\text{g de cRNA}$$

A equação I foi utilizada para determinar a quantidade de cRNA em μg .

$$\text{II)} \quad \frac{\text{Concentração de Cy3 (ou Cy5)}}{\text{Concentração de cRNA em } \mu\text{g}} \times 1000 = \text{pmol Cy3 (ou Cy5) por } \mu\text{g de cRNA}$$

A equação II foi utilizada para determinar a quantidade de fluoróforo incorporada, ou seja, a eficiência de marcação do cRNA (atividade específica). Tanto as quantificações quanto a atividade específica das amostras e da referência se apresentaram dentro do recomendado para uma hibridação eficiente.

d) *Hibridação*

As amostras marcadas foram submetidas à fragmentação de acordo com o protocolo do fabricante, às amostras fragmentadas foi adicionado tampão de hibridização. Após, a reação de hibridização preparada foi depositada sobre a lâmina contendo o genoma humano total (60k – Agilent). As lâminas foram montadas com aparato adequadamente vedado para evitar contaminação de um *array* com o outro e incubadas a 65°C durante 17 horas. As amostras foram distribuídas de forma que cada lâmina contivesse um representante de cada grupo.

e) *Lavagens e leitura dos dados*

Após a hibridização, as lâminas foram lavadas sequencialmente com as soluções de lavagem 1 e 2, seguido da solução de secagem (Agilent). As lâminas foram escaneadas imediatamente e os dados foram extraídos por meio do programa “*feature extraction*” (Agilent). Os dados obtidos foram submetidos ao controle de qualidade por comparação com padrões e controles internos da própria lâmina, conforme as recomendações do fabricante.

f) *Pré-análise dos dados*

Os dados obtidos a partir do *feature extraction* foram analisados por meio do programa GeneSpring GX versão 13 (Agilent). Inicialmente, foi feito o controle de qualidade de cada amostra. As análises prosseguiram com 9 amostras de casos espinhais, 5 casos bulbares e 5 casos controles. Os dados foram filtrados por expressão e foram eliminados das análises valores de fluorescência abaixo de 10% e valores saturados. A partir desta lista, foram realizadas as análises estatísticas conforme descrito abaixo.

g) *Análise estatística*

A partir da planilha filtrada, foi feita a análise de variância (ANOVA) com correção de Benjamini Hochberg com *cut off* de 0,05 e computação permutativa (1.000 permutações) para comparar os grupos experimentais. Em seguida, foi feita a mesma análise com o pós-teste de Tukey para interpretarmos análises entre os grupos determinados no estudo.

4.6 Análises de bioinformática

Análises Enriquecidas

A análise dos aspectos funcionais dos genes diferencialmente expressos obtidos pela análise do *microarray* foi feita utilizando a ferramenta DAVID⁸⁴ (<https://david.ncifcrf.gov/>). Os genes foram organizados de acordo com os bancos de dados disponibilizados pela ferramenta e usados para identificação dos grupos relevantes. Entre os principais bancos de dados em que o DAVID se baseia, estão o *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) e o *Gene Ontology Consortium Annotation* (GOCA), o qual permite organizar os genes por processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares.

Rede de Interação Proteína-Proteína

O plug-in GeneMANIA do programa Cytoscape foi utilizado para prever as interações de proteína a partir da lista de genes diferencialmente expressos obtidas pelas análises de *microarray*. As redes foram geradas usando, primeramente, a informação derivada de vias de sinalização e, posteriormente, a informação de co-expressão⁸⁵.

A conectividade dos nós contidos na rede foi obtida por meio dos parâmetros de centralidade, denominados "*degree*" e "*betweenness*", utilizando o *plug-in* CentiScaPe do Cytoscape⁸⁵. O *degree* é uma medida de estrutura local de redes, que determina o número de arestas em cada nó. Por outro lado, o *betweenness* é uma medida de estrutura global da rede que determina o número de caminhos mais curtos que passam por meio de um nó de ligação específico⁸⁶.

4.7 Ensaios de PCR quantitativo (qRT-PCR)

As reações de transcrição reversa foram realizadas a partir das amostras de RNA obtidas do nervo dos pacientes (grupos espinhais, bulbares e controles). Para os ensaios de qPCR, 100ng de RNA total, foram submetidos à reação de transcrição reversa utilizando-se o kit cDNA Maxima (Thermo), que utiliza a enzima Multiscribe como transcriptase, o protocolo foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante.

As sequências dos iniciadores escolhidos para validação estão apresentadas na Tabela 2. Os transcritos foram escolhidos por se apresentarem em vias de sinalização ou em categorias relevantes na análise enriquecida do *microarray* e pela possível participação dos seus produtos nos mecanismos da doença.

Tabela 1 - Sequências dos oligonucleotídeos que foram utilizados nos experimentos de qPCR e seus respectivos tamanhos de amplificadores (pares de bases, pb)

Gene	Forward	Reverse	Amplificados (pb)
<i>AK1</i>	ATCGTGCAGAAGTATGGCTAC	AGCATGTCCAACACTGTCTC	146
<i>FAU</i>	CTCTTTCTCGACTCCATCTTCG	CTACATGAGCCTTGATCTGGG	138
<i>RPL29</i>	TGTTGACCCTATTTCCCGTG	CATTTCTGTGCCATTTTCGGG	143
<i>RPLP0</i>	TCGTCTTTAAACCCTGCGTG	TGTCTGCTCCCACAATGAAAC	143
<i>TMCC2</i>	CACGGGTGCTAACTCTGC	AACAGGTGCTTCAGACCG	150
<i>UBA52</i>	AGCGTCTGATATTTGCCGG	GTTGTATTTCTGGGCAAGCTG	149
<i>UXT</i>	TTTCCTGGAGTTGACACTGG	TGTAGTTCTCTAAGCCCCTCTAG	147
<i>Normalizador</i>			
<i>ACTB</i>	ACCTTCTACAATGAGCTGCG	CCTGGATAGCAACGTACATGG	148

a) Padronização das Reações para qRT-PCR SYBR

As reações de qPCR foram realizadas no aparelho 7500 *Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) no volume final de 20 µl, contendo 1X *Dynamo Color Flash SYBR Green qPCR kit* (Thermo Scientific), 400 nM de oligonucleotídeos e 10 ng de cDNA. As reações foram realizadas nas condições de ciclagem recomendadas pelo fabricante que, resumidamente, compreendem 7 minutos a 95°C, para a ativação da enzima *Tbr* DNA Polymerase modificada, seguidos de 45 ciclos de desnaturação a 95°C durante 10 segundos e 30 segundos a 60°C, para o pareamento dos iniciadores e extensão. Etapa de 20 minutos de duração foi adicionada ao final da amplificação, na qual a temperatura aumentou gradualmente de 60°C para 98°C a 0,3°C por segundo com

a contínua aquisição da fluorescência, a partir da qual se obteve uma curva de dissociação. Assim, a presença de um pico único confirma a especificidade da amplificação.

O nível de fluorescência emitida aumenta gradualmente, uma vez que, a cada ciclo da reação, novas moléculas de fita dupla são formadas, sendo que o ciclo no qual a fluorescência atinge um determinado limite é inversamente proporcional ao nível de expressão do transcrito analisado⁸⁷. O parâmetro utilizado para avaliação foi o Ct (*Cycle Threshold* ou ciclo limite), uma linha aleatória fixa na região exponencial das reações e usada na determinação do ciclo em que cada reação atinge o máximo de sua eficiência⁸⁸.

Os oligonucleotídeos foram selecionados utilizando-se a ferramenta disponível na Internet <http://www.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/>, a qual forneceu as sequências dos iniciadores e, também, as temperaturas de anelamento e os tamanhos dos fragmentos. A especificidade das sequências foi verificada utilizando-se o BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Diferentes concentrações (400 nM, 800 nM e 1000 nM) foram testadas para cada par de oligonucleotídeos, de forma que as quantidades ideais foram padronizadas individualmente. Serão utilizadas a menor concentração de oligonucleotídeos capaz de fornecer menores valores de Ct, a fim de evitar a formação de estruturas secundárias.

A eficiência para cada par de oligonucleotídeos foi calculada usando cinco diluições seriadas de cDNA convertido de RNA total (100 ng, 20 ng, 4 ng, 0,8 ng e 0,16 ng). A curva foi gerada em logaritmo de base 10 dos resultados dos Cts obtidos para cada concentração de cDNA e o *software* calcula as eficiências de cada par de iniciadores. Para isso, o valor correspondente ao coeficiente angular (*slope*) da equação da curva padrão ($y = ax + b$, $a = \text{slope}$) será utilizado para cálculo da eficiência da reação por meio da seguinte equação:

$$Ef = 10^{(-\frac{1}{\text{slope}})} - 1$$

A expressão diferencial dos transcritos alvo foi determinada pela quantificação relativa em relação à média do gene endógeno actina beta (do Inglês, *beta-actin* – ACTB), uma vez que o experimento do *microarray* não apontou expressão diferencial

em nenhuma comparação estudada. Para o cálculo da medida relativa de expressão, será utilizado o modelo matemático $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$.

b) Análise estatística

Os dados gerados pela técnica de qPCR foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via (*one-way*), seguido pelo pós-teste de Tukey. Os dados foram avaliados e os gráficos foram construídos utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 5.0 (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, CA). Todos os experimentos da PCRq foram realizados utilizando duas replicatas para cada amostra (controle ou ELA). As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa *GraphPad Prism*, versão 5.0 para Windows (*GraphPad Software*, San Diego, Califórnia, USA). Somente foram aceitas como variações significativas aquelas em que a diferença entre os grupos resultaram em *p* menor ou igual a 0,05. Os resultados estão apresentados como média aritmética e erro padrão da média.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Pacientes atendidos no ambulatório ELA do HC-FMUSP

Registros dos pacientes com gênero, raça (cor de pele referida), fénótipo bulbar e espinhal, idade de início da doença, presença de ELA familiar ou não e quem foi para biópsia para análise de microarray estão no Quadro 4.

Quadro 4 – Pacientes atendidos no ambulatório ELA do HC-FMUSP no período de abril de 2011 até abril de 2016

Paciente	Sexo	Raça	Fenótipo	Idade no 1º sintoma	ELA Familiar	Biópsia Microarray
ACB	M	Pardo	Espinhal	58	Não	Não
EAVM	F	Branco	Bulbar	59	Não	Não
PAB	F	Branco	Espinhal	48	Não	Não
PJFA	M	Branco	Espinhal	37	Não	Não
PHAF	M	Branco	Espinhal	53	Não	Não
PMCV	M	Branco	Espinhal	69	Não	Não
PJSA	M	Branco	Espinhal	52	Não	Não
PPS	M	Pardo	Espinhal	57	Não	Não
PSRC	M	Negro	Espinhal	70	Não	Não
PS	F	Pardo	Espinhal	64	Não	Não
ROF	M	Negro	Espinhal	66	Não	Não
RBB	M	Pardo	Espinhal	44	Não	Não
RFV	F	Branco	Espinhal	59	Não	Não
RCP	M	Branco	Espinhal	26	Não	Não
JES	M	Negro	Espinhal	59	Não	Não
MRNB	F	Branco	Espinhal	60	Não	Não
JCCS	M	Branco	Espinhal	33	Não	Não
CASG	M	Branco	Espinhal	37	Não	Não
CMA	M	Pardo	Espinhal	37	Não	Não
JFS	M	Branco	Espinhal	51	Sim	Não
DRNS	F	Branco	Bulbar	52	Não	Não

continua

continuação

Quadro 4 – Pacientes atendidos no ambulatório ELA do HC-FMUSP no período de abril de 2011 até abril de 2016

Paciente	Sexo	Raça	Fenótipo	Idade no 1º sintoma	ELA Familiar	Biópsia Microarray
JMA	M	Branco	Bulbar	65	Não	Não
JMSS	M	Branco	Bulbar	48	Não	Não
JRM	M	Branco	Espinhal	43	Não	Não
JRR	M	Pardo	Espinhal	50	Não	Não
JACS	M	Branco	Espinhal	43	Não	Não
JNA	M	Pardo	Bulbar	52	Não	Não
RFV	F	Branco	Bulbar	52	Não	Sim
MGR	F	Branco	Espinhal	52	Sim	Não
SB	M	Branco	Bulbar	59	Não	Não
SGN	M	Branco	Espinhal	59	Não	Não
GJS	M	Branco	Espinhal	37	Não	Não
MVBN	M	Branco	Espinhal	37	Não	Não
LSC	M	Branco	Espinhal	38	Não	Não
LCV	F	Branco	Espinhal	38	Não	Não
ODJ	M	Branco	Espinhal	20	Não	Não
AC	M	Branco	Espinhal	18	Não	Não
ALA	F	Branco	Espinhal	20	Não	Não
RAD	M	Branco	Espinhal	20	Não	Não
BVS	F	Branco	Espinhal	21	Não	Não
DCB	F	Branco	Espinhal	22	Sim	Não
PFC	F	Branco	Espinhal	22	Não	Não
CAD.	M	Branco	Espinhal	41	Sim	Não
MLPR	F	Branco	Espinhal	42	Não	Não
SMFAH	F	Branco	Espinhal	42	Sim	Não
MB	M	Branco	Espinhal	42	Não	Não
CSO	M	Branco	Espinhal	43	Não	Não
ORB	F	Branco	Espinhal	43	Não	Não
CSS	M	Negro	Espinhal	43	Não	Não
JMS.	M	Pardo	Espinhal	43	Não	Não
NN	F	Negro	Espinhal	37	Não	Não
VSO	M	Branco	Espinhal	37	Não	Não
CSS.	F	Branco	Bulbar	38	Não	Não

continua

continuação

Quadro 4 – Pacientes atendidos no ambulatório ELA do HC-FMUSP no período de abril de 2011 até abril de 2016

Paciente	Sexo	Raça	Fenótipo	Idade no 1º sintoma	ELA Familiar	Biópsia Microarray
EL	M	Amarelo	Espinhal	44	Não	Não
AA	M	Branco	Espinhal	44	Não	Não
SFL	M	Branco	Espinhal	44	Não	Não
PCG	M	Branco	Espinhal	45	Não	Não
VLT	F	Pardo	Espinhal	50	Não	Não
VMF	F	Branco	Espinhal	55	Não	Não
VA	M	Branco	Espinhal	55	Não	Não
VP	M	Branco	Espinhal	73	Não	Não
WL	M	Branco	Espinhal	47	Não	Não
WPP	M	Branco	Espinhal	61	Não	Não
WS	M	Pardo	Espinhal	46	Não	Não
WT	M	Branco	Espinhal	80	Não	Não
WLS	M	Branco	Espinhal	41	Não	Não
YLO	F	Branco	Bulbar	56	Não	Não
EVS	F	Branco	Espinhal	45	Não	Sim
EMZ	F	Branco	Espinhal	45	Não	Não
OAL	M	Branco	Espinhal	45	Não	Não
ERS	F	Branco	Bulbar	46	Não	Não
MFRA	M	Branco	Espinhal	42	Não	Não
AC.	M	Branco	Espinhal	42	Não	Não
MSB	M	Branco	Espinhal	42	Não	Não
GSS	M	Branco	Bulbar	43	Não	Não
RSM	M	Branco	Bulbar	43	Não	Não
NDA	M	Branco	Bulbar	46	Não	Não
JCAO	M	Branco	Espinhal	46	Sim	Não
MAS	M	Pardo	Espinhal	46	Não	Não
JM.S	M	Branco	Espinhal	46	Não	Não
VPM	F	Branco	Espinhal	46	Não	Não
MCKI	M	Branco	Espinhal	46	Não	Não
MMR	F	Branco	Espinhal	47	Não	Não
AJM	M	Pardo	Espinhal	47	Sim	Não
MFC	M	Branco	Espinhal	38	Não	Não

continua

continuação

Quadro 4 – Pacientes atendidos no ambulatório ELA do HC-FMUSP no período de abril de 2011 até abril de 2016

Paciente	Sexo	Raça	Fenótipo	Idade no 1º sintoma	ELA Familiar	Biópsia Microarray
JCL	M	Branco	Espinhal	38	Não	Não
AMS	M	Pardo	Espinhal	39	Não	Não
NJS	F	Branco	Espinhal	39	Não	Não
AFA	M	Branco	Espinhal	40	Sim	Não
ISR	F	Negro	Espinhal	40	Não	Não
AROO	M	Branco	Espinhal	40	Não	Não
WPN	M	Branco	Espinhal	41	Sim	Não
ACRG	M	Branco	Espinhal	47	Não	Não
MFCF	F	Branco	Espinhal	47	Não	Não
AGC	M	Branco	Espinhal	49	Não	Não
YK	M	Amarelo	Espinhal	54	Não	Não
DVTF	F	Branco	Espinhal	45	Não	Não
JMS	M	Negro	Espinhal	49	Não	Não
JCPAR	M	Branco	Espinhal	49	Não	Não
MSSA	F	Pardo	Espinhal	49	Não	Não
JCMC	M	Branco	Bulbar	50	Não	Não
CAD	F	Branco	Espinhal	50	Não	Não
FSDS	M	Pardo	Espinhal	50	Não	Não
MJSR	F	Branco	Espinhal	50	Não	Não
LPO	M	Branco	Espinhal	51	Não	Não
RB	F	Branco	Espinhal	51	Não	Não
SSS	F	Branco	Espinhal	47	Não	Não
SDAF	M	Branco	Espinhal	47	Não	Não
SBS	M	Branco	Espinhal	47	Não	Não
SFS	F	Branco	Espinhal	47	Não	Não
MLAS	F	Branco	Espinhal	51	Não	Não
GFG	M	Branco	Espinhal	51	Não	Não
DATA	F	Branco	Espinhal	52	Não	Não
FDC	F	Branco	Espinhal	54	Não	Sim
MRMRM	F	Branco	Espinhal	52	Não	Não
JCS	M	Branco	Espinhal	52	Não	Não
JRAB	M	Pardo	Espinhal	52	Não	Não

continua

continuação

Quadro 4 – Pacientes atendidos no ambulatório ELA do HC-FMUSP no período de abril de 2011 até abril de 2016

Paciente	Sexo	Raça	Fenótipo	Idade no 1º sintoma	ELA Familiar	Biópsia Microarray
PAS.	M	Branco	Espinhal	52	Não	Não
AR	F	Branco	Bulbar	53	Não	Não
EMM	F	Branco	Bulbar	54	Não	Sim
EKT	F	Branco	Espinhal	53	Não	Não
FJN	M	Branco	Espinhal	53	Não	Não
RGM	F	Branco	Espinhal	53	Não	Não
AFS	M	Branco	Espinhal	53	Não	Não
ALS	F	Pardo	Espinhal	53	Não	Não
VRF	M	Negro	Espinhal	53	Não	Não
MSCP	F	Branco	Bulbar	54	Não	Não
SSLA	F	Branco	Espinhal	47	Não	Não
AADT	F	Branco	Espinhal	47	Sim	Não
FSSF	M	Branco	Espinhal	47	Não	Não
RAMJ	M	Branco	Espinhal	49	Não	Não
MCV	F	Branco	Bulbar	54	Não	Não
DMJ	M	Branco	Espinhal	54	Não	Não
OCA	M	Branco	Espinhal	54	Não	Não
JOAD	M	Branco	Espinhal	54	Não	Não
GRF	F	Branco	Espinhal	55	Não	Não
MASL	F	Branco	Espinhal	55	Não	Não
JMR	M	Pardo	Espinhal	62	Não	Não
JMHA	M	Amarelo	Bulbar	41	Não	Não
JML	M	Negro	Bulbar	40	Não	Não
JOA	M	Pardo	Espinhal	65	Não	Não
JRJS	M	Branco	Espinhal	43	Não	Não
JV	M	Branco	Espinhal	63	Não	Não
JWF	M	Branco	Espinhal	40	Não	Não
VA	M	Negro	Espinhal	55	Não	Não
LFS	M	Branco	Bulbar	56	Não	Não
EGG	M	Branco	Espinhal	56	Não	Não
RNO	F	Branco	Espinhal	49	Não	Não
RL	F	Branco	Espinhal	39	Não	Não

continua

continuação

Quadro 4 – Pacientes atendidos no ambulatório ELA do HC-FMUSP no período de abril de 2011 até abril de 2016

Paciente	Sexo	Raça	Fenótipo	Idade no 1º sintoma	ELA Familiar	Biópsia Microarray
RMMV	F	Branco	Bulbar	60	Não	Não
RMS	F	Branco	Espinhal	49	Não	Não
STB	F	Pardo	Espinhal	40	Não	Não
SAOPF	M	Branco	Bulbar	50	Não	Não
EMC	M	Branco	Espinhal	56	Não	Não
GAPM	M	Branco	Espinhal	56	Não	Não
SAT	M	Pardo	Espinhal	57	Não	Sim
SA	M	Branco	Espinhal	64	Não	Não
SC	M	Branco	Espinhal	52	Não	Não
SO	M	Branco	Espinhal	23	Não	Não
SAPG	M	Branco	Bulbar	60	Não	Não
AMSD	F	Branco	Espinhal	57	Não	Não
MCBL	F	Branco	Espinhal	57	Não	Não
VLFM	F	Branco	Espinhal	57	Não	Não
MFF	F	Branco	Espinhal	57	Não	Não
JMP	M	Branco	Espinhal	57	Não	Não
AJS	M	Branco	Bulbar	58	Não	Não
MCSP	F	Branco	Espinhal	58	Não	Não
PIS	M	Branco	Espinhal	58	Não	Não
PJT	M	Branco	Espinhal	58	Não	Não
AS	M	Branco	Espinhal	60	Não	Não
JBS.	M	Pardo	Espinhal	60	Não	Não
JPS	M	Branco	Espinhal	61	Não	Não
MOVG	F	Pardo	Bulbar	62	Não	Não
FCRA	M	Branco	Espinhal	62	Não	Não
IFS	M	Negro	Espinhal	65	Não	Não
JA	M	Branco	Espinhal	65	Não	Não
LCS	M	Pardo	Espinhal	30	Não	Não
GCSC	F	Branco	Espinhal	31	Sim	Não
EES	F	Branco	Espinhal	62	Não	Não
MS	F	Pardo	Espinhal	62	Não	Não
AVB	M	Branco	Espinhal	63	Não	Não

continua

continuação

Quadro 4 – Pacientes atendidos no ambulatório ELA do HC-FMUSP no período de abril de 2011 até abril de 2016

Paciente	Sexo	Raça	Fenótipo	Idade no 1º sintoma	ELA Familiar	Biópsia Microarray
MASG	F	Branco	Espinhal	54	Não	Não
SCPS	F	Branco	Espinhal	54	Não	Não
JP	M	Pardo	Espinhal	55	Não	Não
OPS	M	Branco	Espinhal	55	Não	Não
RMS	F	Negro	Espinhal	55	Não	Não
MVC	F	Branco	Espinhal	55	Não	Não
ASS	F	Branco	Espinhal	63	Não	Não
FLM	M	Branco	Espinhal	63	Não	Não
MMI	M	Amarelo	Espinhal	63	Não	Não
RJRS	F	Pardo	Espinhal	63	Não	Não
FPM	M	Branco	Espinhal	64	Não	Não
AFC	M	Branco	Espinhal	44	Não	Não
MSSA.	F	Negro	Espinhal	44	Não	Não
SRS	M	Branco	Espinhal	44	Sim	Não
PRS	M	Branco	Bulbar	45	Não	Sim
MGN	F	Branco	Espinhal	45	Não	Não
CM	M	Branco	Espinhal	64	Não	Não
JRF	M	Branco	Espinhal	65	Não	Não
LSR	M	Branco	Espinhal	65	Não	Não
ASF	M	Branco	Espinhal	65	Sim	Não
DPO	M	Branco	Espinhal	65	Não	Não
MAC	M	Branco	Espinhal	65	Não	Não
DPS	F	Branco	Espinhal	31	Não	Não
AFC.	F	Branco	Espinhal	31	Não	Não
MBS	F	Branco	Espinhal	31	Não	Não
CAN	M	Branco	Espinhal	32	Não	Não
JCSS	M	Branco	Espinhal	32	Não	Não
AAP	M	Branco	Espinhal	32	Não	Não
MFGM	F	Branco	Espinhal	32	Não	Não
NC	M	Branco	Espinhal	65	Não	Não
AN	F	Branco	Bulbar	66	Não	Não
OMS	M	Branco	Espinhal	66	Não	Não

continua

continuação

Quadro 4 – Pacientes atendidos no ambulatório ELA do HC-FMUSP no período de abril de 2011 até abril de 2016

Paciente	Sexo	Raça	Fenótipo	Idade no 1º sintoma	ELA Familiar	Biópsia Microarray
PSC	F	Branco	Espinhal	66	Não	Não
JS	M	Branco	Espinhal	67	Não	Não
EKK	F	Amarelo	Espinhal	67	Não	Não
MCS	F	Branco	Espinhal	68	Não	Não
HB	F	Branco	Bulbar	69	Sim	Não
BEO	M	Pardo	Espinhal	69	Não	Não
EBS	F	Branco	Bulbar	70	Não	Não
RP	F	Branco	Bulbar	70	Não	Não
MDS	F	Branco	Espinhal	70	Não	Não
BGT	F	Branco	Espinhal	70	Não	Não
MJC	F	Branco	Bulbar	71	Não	Não
GJR	M	Branco	Espinhal	71	Não	Não
MGS	F	Branco	Bulbar	66	Não	Não
SMA	F	Branco	Bulbar	66	Não	Não
JBS	M	Branco	Espinhal	66	Não	Não
LBL	M	Branco	Espinhal	71	Não	Não
RRF	F	Branco	Espinhal	73	Não	Não
MCPM	F	Branco	Espinhal	75	Sim	Não
AOL	F	Branco	Bulbar	76	Não	Não
SN	F	Amarelo	Bulbar	76	Não	Não
TJR	F	Pardo	Espinhal	76	Não	Não
AFSX	M	Branco	Espinhal	77	Não	Não
ESA	F	Branco	Bulbar	78	Não	Não
MLR	F	Branco	Bulbar	82	Não	Não
NMJ	F	Branco	Espinhal	82	Não	Não
ENM	M	Branco	Espinhal	82	Não	Não
ADN	M	Branco	Espinhal	56	Não	Não
ACC	M	Branco	Bulbar	42	Sim	Não
AMS	F	Negro	Espinhal	25	Não	Não
AD	M	Branco	Espinhal	63	Não	Não
ASM	M	Branco	Espinhal	38	Não	Não
ASM	M	Branco	Espinhal	49	Não	Não

continua

continuação

Quadro 4 – Pacientes atendidos no ambulatório ELA do HC-FMUSP no período de abril de 2011 até abril de 2016

Paciente	Sexo	Raça	Fenótipo	Idade no 1º sintoma	ELA Familiar	Biópsia Microarray
AP	M	Branco	Espinhal	60	Não	Não
ARP	M	Branco	Bulbar	41	Não	Não
AJQ	M	Branco	Espinhal	47	Não	Não
APS	M	Branco	Bulbar	67	Não	Não
AFR	F	Branco	Espinhal	47	Não	Não
AAS	M	Branco	Espinhal	59	Não	Não
ART	M	Branco	Espinhal	48	Não	Não
AMP	F	Branco	Espinhal	62	Não	Não
APL	F	Branco	Bulbar	23	Não	Não
AFS	F	Branco	Espinhal	57	Não	Não
ATC	F	Branco	Bulbar	58	Não	Não
AGS	M	Branco	Espinhal	61	Não	Não
ALP	M	Branco	Espinhal	27	Não	Não
APB	F	Branco	Espinhal	59	Não	Não
AHT	F	Amarelo	Espinhal	64	Não	Não
ACB	M	Branco	Espinhal	46	Não	Não
AS	M	Branco	Espinhal	53	Não	Não
AGS	M	Branco	Espinhal	60	Não	Não
APRS	M	Branco	Espinhal	52	Não	Não
AP	M	Branco	Espinhal	65	Não	Não
ASC	F	Branco	Espinhal	45	Não	Não
AVC	F	Pardo	Espinhal	62	Não	Sim
AGC	M	Pardo	Espinhal	65	Não	Não
ARS	M	Branco	Bulbar	58	Não	Não
BBC	F	Pardo	Bulbar	62	Não	Não
BAB	M	Branco	Espinhal	40	Não	Não
CRA	M	Branco	Espinhal	43	Não	Não
CMC	F	Branco	Espinhal	64	Não	Não
CAM	F	Branco	Espinhal	61	Não	Não
COP	F	Branco	Espinhal	43	Não	Não
CSP	M	Branco	Bulbar	40	Não	Não
CBC	F	Branco	Bulbar	67	Não	Não

continua

continuação

Quadro 4 – Pacientes atendidos no ambulatório ELA do HC-FMUSP no período de abril de 2011 até abril de 2016

Paciente	Sexo	Raça	Fenótipo	Idade no 1º sintoma	ELA Familiar	Biópsia Microarray
CM	F	Branco	Espinhal	54	Sim	Não
CSC	M	Branco	Espinhal	60	Não	Não
CRA	M	Branco	Espinhal	47	Não	Não
CPK	M	Branco	Espinhal	58	Não	Não
CMPL	F	Branco	Espinhal	47	Não	Não
DSL	M	Branco	Espinhal	60	Não	Não
DMC	F	Branco	Bulbar	66	Não	Não
DCS	M	Branco	Espinhal	45	Não	Não
DFN	F	Pardo	Espinhal	54	Não	Não
DCS	M	Branco	Espinhal	40	Não	Não
DBP	F	Branco	Espinhal	68	Não	Não
DSOR	F	Branco	Espinhal	43	Não	Não
DFJ	F	Branco	Bulbar	77	Não	Não
DFN	M	Branco	Espinhal	60	Não	Não
DJS	M	Pardo	Espinhal	40	Não	Não
DM	M	Branco	Bulbar	73	Não	Não
EC	M	Branco	Espinhal	53	Não	Não
EB	M	Branco	Espinhal	50	Não	Não
EBS	M	Branco	Bulbar	53	Não	Não
ENV	M	Branco	Espinhal	25	Não	Não
EAS	F	Pardo	Bulbar	63	Não	Não
EPG	F	Pardo	Espinhal	34	Não	Não
EFS	F	Branco	Bulbar	58	Não	Não
MQB	F	Branco	Espinhal	61	Não	Não
RPSA	F	Branco	Espinhal	61	Não	Não
FLS	M	Branco	Espinhal	61	Não	Não
MAGF	M	Branco	Espinhal	61	Não	Não
RT	M	Branco	Espinhal	61	Não	Não
EOS	F	Branco	Espinhal	44	Não	Não
ENP	F	Branco	Espinhal	68	Não	Não
EDC	M	Branco	Bulbar	69	Não	Não
EMA	M	Branco	Espinhal	41	Não	Não

continua

continuação

Quadro 4 – Pacientes atendidos no ambulatório ELA do HC-FMUSP no período de abril de 2011 até abril de 2016

Paciente	Sexo	Raça	Fenótipo	Idade no 1º sintoma	ELA Familiar	Biópsia Microarray
EEF	M	Pardo	Bulbar	60	Não	Não
EMRS	F	Branco	Bulbar	67	Não	Não
EBS	M	Branco	Espinhal	87	Não	Não
EPR	F	Pardo	Espinhal	49	Não	Não
EGS	M	Branco	Espinhal	64	Não	Não
EGGP	F	Branco	Bulbar	78	Não	Não
FSAB	M	Branco	Espinhal	34	Não	Não
LPPMF	M	Branco	Espinhal	23	Não	Não
GMS	F	Branco	Espinhal	24	Não	Não
MF	M	Branco	Bulbar	34	Não	Não
IVBS	M	Branco	Espinhal	34	Não	Não
EAS	M	Pardo	Espinhal	34	Não	Não
RVF	F	Branco	Espinhal	34	Não	Não
ERL	M	Branco	Espinhal	35	Não	Sim
JAI	M	Branco	Espinhal	35	Não	Não
JPP	M	Branco	Espinhal	35	Não	Não
MAS.	M	Branco	Espinhal	35	Não	Não
MEB	M	Branco	Espinhal	35	Não	Não
DVBOS	F	Branco	Espinhal	35	Não	Não
RFO	F	Branco	Espinhal	36	Não	Não
RG	M	Pardo	Espinhal	26	Não	Não
AJR	M	Branco	Espinhal	28	Não	Não
CEG	M	Branco	Espinhal	28	Não	Não
IAPS	F	Pardo	Espinhal	28	Não	Não
RAL	M	Branco	Espinhal	29	Não	Não
RATA	M	Branco	Espinhal	30	Não	Não
JNBS	M	Pardo	Espinhal	30	Não	Não
FAB	F	Branco	Espinhal	79	Não	Não
FS	M	Amarelo	Espinhal	48	Sim	Não
FBE	F	Pardo	Bulbar	26	Não	Não
FMS	F	Branco	Espinhal	64	Não	Não
FNC	F	Branco	Espinhal	62	Não	Não

continua

continuação

Quadro 4 – Pacientes atendidos no ambulatório ELA do HC-FMUSP no período de abril de 2011 até abril de 2016

Paciente	Sexo	Raça	Fenótipo	Idade no 1º sintoma	ELA Familiar	Biópsia Microarray
FJL	M	Branco	Espinhal	52	Não	Não
GOTL	F	Branco	Bulbar	52	Sim	Não
GJS	M	Branco	Espinhal	54	Não	Sim
GLS	M	Branco	Espinhal	43	Não	Não
GP	M	Branco	Espinhal	55	Não	Não
GM	M	Branco	Bulbar	77	Não	Não
HSC	M	Pardo	Espinhal	33	Não	Não
HAF	M	Branco	Espinhal	53	Não	Não
HS	M	Pardo	Espinhal	57	Não	Não
HTBB	F	Pardo	Bulbar	62	Não	Não
HRS	F	Branco	Bulbar	73	Não	Não
HJSM	M	Branco	Espinhal	40	Não	Não
IMS	F	Branco	Espinhal	44	Não	Não
APS	F	Branco	Espinhal	50	Não	Não
WOM	M	Branco	Espinhal	50	Não	Não
CCY	M	Branco	Espinhal	50	Não	Não
IMS	F	Pardo	Bulbar	59	Não	Não
IMFS	F	Branco	Espinhal	45	Não	Não
IM	F	Branco	Espinhal	40	Não	Não
IPA	F	Branco	Espinhal	64	Não	Não
IBS	F	Branco	Espinhal	48	Não	Não
IMSL	F	Branco	Espinhal	70	Não	Não
IMV	F	Branco	Espinhal	64	Sim	Não
IC	M	Pardo	Espinhal	70	Não	Não
IM	F	Branco	Espinhal	50	Sim	Não
JMSR	F	Pardo	Bulbar	59	Não	Não
JCR	M	Branco	Espinhal	21	Não	Não
JES	M	Branco	Espinhal	29	Não	Não
JSS	F	Branco	Espinhal	67	Não	Não
JRSOF	M	Branco	Espinhal	52	Não	Não
JAF	M	Branco	Espinhal	72	Não	Não
JFS	M	Pardo	Espinhal	51	Não	Não

continua

continuação

Quadro 4 – Pacientes atendidos no ambulatório ELA do HC-FMUSP no período de abril de 2011 até abril de 2016

Paciente	Sexo	Raça	Fenótipo	Idade no 1º sintoma	ELA Familiar	Biópsia Microarray
JGD	M	Pardo	Espinhal	39	Não	Não
JA	M	Branco	Espinhal	54	Não	Não
JEB	M	Branco	Espinhal	45	Não	Não
JAO	M	Pardo	Espinhal	52	Não	Não
JASF	M	Branco	Espinhal	39	Sim	Não
JAL	M	Branco	Bulbar	57	Não	Sim
JCG	M	Branco	Espinhal	58	Não	Não
JJR	M	Pardo	Espinhal	66	Não	Não
JDM	M	Negro	Espinhal	47	Não	Não
JESA	M	Branco	Espinhal	37	Não	Não
JHR	M	Pardo	Espinhal	66	Não	Não
JLDE	M	Pardo	Espinhal	63	Não	Não
JES	F	Pardo	Bulbar	60	Não	Não
KY	M	Amarelo	Espinhal	72	Não	Não
KUO	F	Amarelo	Bulbar	70	Não	Não
LGMB	F	Branco	Espinhal	52	Não	Não
LPS	M	Branco	Espinhal	40	Não	Sim
LYF	M	Amarelo	Espinhal	68	Não	Não
LR	M	Branco	Espinhal	72	Não	Não
LMC	M	Pardo	Espinhal	52	Não	Não
LSM	F	Branco	Espinhal	80	Não	Não
LAR	F	Branco	Bulbar	29	Não	Não
LSR	M	Branco	Espinhal	65	Não	Não
LKT	F	Amarelo	Espinhal	63	Não	Não
LCL	M	Branco	Espinhal	49	Não	Não
LM	M	Branco	Espinhal	66	Não	Não
MMGP	F	Branco	Espinhal	47	Não	Não
MF	M	Branco	Espinhal	63	Não	Não
MAMP	M	Branco	Espinhal	41	Não	Não
MPSS	M	Branco	Espinhal	34	Não	Não
MCSB	F	Branco	Bulbar	63	Não	Não
MGS	F	Branco	Espinhal	61	Não	Não

continua

continuação

Quadro 4 – Pacientes atendidos no ambulatório ELA do HC-FMUSP no período de abril de 2011 até abril de 2016

Paciente	Sexo	Raça	Fenótipo	Idade no 1º sintoma	ELA Familiar	Biópsia Microarray
MGL	F	Branco	Espinhal	52	Não	Não
MFFF	F	Pardo	Espinhal	40	Não	Não
MLO	F	Branco	Espinhal	64	Não	Não
MSC	F	Branco	Espinhal	71	Não	Não
MDSN	F	Branco	Bulbar	52	Não	Não
MJA	F	Branco	Bulbar	71	Não	Não
MMSR	F	Branco	Bulbar	53	Não	Não
MSB	F	Branco	Espinhal	51	Não	Não
MCS	F	Branco	Espinhal	54	Não	Não
MCA	F	Branco	Espinhal	32	Não	Não
MRT	F	Pardo	Espinhal	57	Não	Não
MP	M	Branco	Espinhal	45	Não	Não
NCLC	F	Branco	Espinhal	54	Não	Não
NO	M	Pardo	Espinhal	54	Não	Não
NMC	M	Branco	Bulbar	60	Não	Não
NZ	M	Branco	Bulbar	66	Não	Não
NMP	F	Pardo	Espinhal	64	Não	Não
NSC	M	Branco	Espinhal	50	Não	Não
NA	M	Branco	Espinhal	74	Não	Não
OBM	M	Branco	Bulbar	63	Não	Sim
ORN	M	Branco	Bulbar	47	Não	Não
ACB.	M	Branco	Espinhal	56	Não	Não
ARD	M	Branco	Espinhal	56	Não	Não
MPB	M	Branco	Espinhal	56	Não	Sim
PAS	F	Amarelo	Espinhal	56	Não	Não
OMJD	F	Pardo	Espinhal	50	Não	Não
OJL	M	Pardo	Espinhal	39	Não	Não
OMG	F	Branco	Bulbar	71	Não	Não
ORN	M	Branco	Espinhal	31	Não	Não
OMRJ	M	Pardo	Bulbar	47	Não	Não
OST	M	Branco	Espinhal	65	Não	Não
RM	M	Branco	Espinhal	72	Não	Não

continua

conclusão

Quadro 4 – Pacientes atendidos no ambulatório ELA do HC-FMUSP no período de abril de 2011 até abril de 2016

Paciente	Sexo	Raça	Fenótipo	Idade no 1º sintoma	ELA Familiar	Biópsia Microarray
RSS	M	Branco	Espinhal	38	Não	Não
SRBL	M	Negro	Espinhal	37	Não	Não
SAMOG	F	Branco	Espinhal	41	Não	Não
SMAM	M	Branco	Espinhal	45	Não	Não
TRPC	F	Branco	Espinhal	49	Não	Não
TPS	M	Pardo	Espinhal	43	Não	Não
VBM	F	Branco	Espinhal	30	Não	Não
VLS	F	Branco	Espinhal	42	Não	Não
VLSF	F	Branco	Espinhal	53	Não	Não
VLGO	F	Branco	Espinhal	54	Não	Não
VLSZ	F	Branco	Espinhal	56	Não	Sim

Distribuição de casos de ELA Familiar (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Distribuição de casos de ELA familiar na amostra de 448 indivíduos

Variação da idade de início em cada um dos fenótipos da ELA (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Variação da idade de aparecimento do primeiro sintoma de acordo com o subtipo de ELA

Distribuição dos pacientes masculinos e femininos (Gráfico 3) em cada um dos fenótipos da ELA.

Gráfico 3 – Distribuição do subtipo de ELA de acordo com o sexo

Resumo das características clínicas dos pacientes do Ambulatório de ELA do HC-FMUSP (Tabela 2).

Tabela 2 - Características descritivas dos 448 participantes do estudo, de acordo com o diagnóstico do subtipo de ELA, abril/2011-abril/2016

Características	Subtipo de ELA			P valor
	Espinal (n=369)	Bulbar (n=79)	Total (N=21)	
Média de idade (anos) ($\pm$ DP)	51 ($\pm$ 12,9)	57 ($\pm$ 12,5)	52 ($\pm$ 12,5)	<0,0001
Sexo, n (%)				
Homem	231 (62,6)	32 (40,5)	263 (58,7)	<0,0001
Mulher	138 (37,4)	47 (59,5)	185 (41,3)	
Raça (cor da pele), n (%)				
Branco	290 (78,6)	64 (81,0)	354 (79,0)	0,62
Pardo	54 (14,6)	11 (13,9)	65 (14,5)	
Negro	15 (4,1)	1 (1,3)	16 (3,6)	
Amarelo	10 (2,7)	3 (3,8)	13 (2,9)	

DP: desvio padrão

Os valores de p foram derivados dos testes de Qui-quadrado ou Exato de Fisher para as variáveis categóricas e T-Student para as variáveis contínuas.

5.2 Biópsias do nervo periférico de pacientes com ELA e controles

Para os experimentos de *microarray*, foram utilizadas biópsias do nervo extensor curto do hálux de 14 pacientes ELA (9 forma espinal e 5 bulbar) e biópsias de 5 sujeitos-controle. Quadros 4 e 5, respectivamente.

Quadro 5 - Relação dos pacientes submetidos à biópsia do nervo extensor curto do hálux para análise de *Microarray*

Pacientes	Gênero	Data da biópsia	Idade na biópsia	Fenótipo	Duração até a biópsia (meses)
ELA 1	Masculino	ago/11	47	Bulbar	28
ELA 3	Masculino	out/11	42	Espinal	102
ELA 5	Masculino	jan/12	42	Espinal	24
ELA 6	Feminino	fev/12	64	Espinal	25
ELA 7	Masculino	abr/12	55	Espinal	15
ELA 8	Masculino	abr/12	63	Espinal	62

continua

conclusão

Quadro 5 - Relação dos pacientes submetidos à biópsia do nervo extensor curto do hálux para análise de *Microarray*

ELA 9	Feminino	mai/12	57	Espinhal	34
ELA 11	Masculino	nov/12	60	Espinhal	34
ELA 12	Feminino	dez/12	58	Espinhal	26
ELA 13	Feminino	fev/13	58	Bulbar	39
ELA 14	Feminino	mai/13	47	Espinhal	25
ELA 15	Masculino	mai/13	66	Bulbar	32
ELA 16	Masculino	jun/13	58	Bulbar	25
ELA 22	Feminino	dez/15	52	Bulbar	23

Os registros dos pacientes acima estão arquivados no ambulatório. Pela confidencialidade firmada, apresentaremos apenas nas necessidades justificadas.

Relação dos pacientes do ambulatório que foram biopsiados e com o *microarray* analisados com os que não foram está representada na Tabela 3.

Tabela 3 - Comparação das características descritivas dentre os 14 participantes com biópsia e os 434 participantes sem biópsia, abril/2011-abril/2016

Características	Biópsia			P valor
	Sim (n=14)	Não (n=434)	Total (N=448)	
Subtipo ELA				
espinhal	9 (64,3)	360 (82,9)	369 (82,4)	0,07
bulbar	5 (35,7)	74 (17,1)	79 (17,6)	
Média de idade (anos) ($\pm$ DP)	52 ($\pm$ 8,1)	52 ($\pm$ 13,3)	52 ($\pm$ 12,5)	0,88
Sexo, n (%)				
homem	8 (57,1)	255 (58,8)	263 (58,7)	0,90
mulher	6 (42,9)	179 (41,2)	185 (41,3)	
Raça (cor da pele), n (%)				
branco	12 (85,7)	342 (78,8)	354 (79,0)	0,80
Pardo	2 (14,3)	63 (14,5)	65 (14,5)	
Negro	-	16 (3,7)	16 (3,6)	
amarelo	-	13 (3,0)	13 (2,9)	

DP: desvio padrão

Os valores de p foram derivados dos testes de Qui-quadrado ou Exato de Fisher para as variáveis categóricas e T-Student para as variáveis contínuas.

5.3 Análise do Microarray

Genes Diferencialmente Expressos pela Análise do Microarray

Todos os genes diferencialmente expressos e seus respectivos valores de *fold* estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Lista de genes diferencialmente expressos obtidos a partir de análises de *microarray* de nervos motores de pacientes com ELA, casos bulbares (B) e espinhais (E), e indivíduos-controle (CT)

Nome da Probe	Símbolo do Gene	Nome do Gene	<i>Fold</i> B x CT	<i>Fold</i> E x CT	<i>Fold</i> E x B
A_23_P44569	ABCC2	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2	32,83	23,64	
A_23_P138706	ADRA2A	Adrenoceptor alpha 2 ^a	11,80	18,96	
A_23_P21363	AHNAK	AHNAK nucleoprotein	1,88	2,23	
A_23_P217088	AK1	Adenylate kinase 1	1,76		-1,56
A_33_P3360097	APRT	Adenine phosphoribosyltransferase	1,68	1,33	-1,27
A_24_P333571	ARHGAP29	Rho GTPase activating protein 29	3,13	6,69	2,14
A_23_P18384	ARMC8	Armadillo repeat containing 8		1,74	2,85
A_24_P181672	B3GNTL1	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-like 1		-2,61	-1,71
A_24_P40551	BEX4	Brain expressed, X-linked 4	-3,06		2,27
A_23_P19723	BMP5	Bone morphogenetic protein 5	8,39	13,72	
A_21_P0002851	BSN-AS2	BSN antisense RNA 2 (head to head)	1,87		-2,39
A_33_P3361442	C19orf73	Chromosome 19 open reading frame 73	-4,96		5,15
A_33_P3275510	C20orf196	Chromosome 20 open reading frame 196	4,81	3,02	
A_19_P00318323	CASC15	Cancer susceptibility candidate 15 (non-protein coding)	-3,32	-1,83	1,82
A_23_P363255	CCDC68	Coiled-coil domain containing 68	1,69	-1,65	-2,80
A_24_P125335	CCL13	Chemokine (C-C motif) ligand 13	19,32	16,53	
A_33_P3294509	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	10,70	8,59	
A_23_P411296	CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	-4,23	-3,51	
A_33_P3281850	CGREF1	Cell growth regulator with EF-hand domain 1	2,75		-3,91
A_32_P209960	CIITA	Class II, major histocompatibility complex, transactivator	3,01	7,68	2,55

continua

continuação

Tabela 4 - Lista de genes diferencialmente expressos obtidos a partir de análises de *microarray* de nervos motores de pacientes com ELA, casos bulbares (B) e espinhais (E), e indivíduos-controle (CT)

Nome da Probe	Símbolo do Gene	Nome do Gene	Fold B x CT	Fold E x CT	Fold E x B
A_23_P214969	<i>CITED2</i>	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	-2,75	-2,21	
A_21_P0013564	<i>CNTNAP3B</i>	Contactin associated protein-like 3B	5,96	6,10	
A_23P301925	<i>COX1</i>	Cytochrome c oxidase subunit I	-1,85	-2,61	
A_23_P112798	<i>CRIP2</i>	Cysteine-rich protein 2	3,25	2,14	
A_33_P3358158	<i>CRYBB2P1</i>	Crystallin, beta B2 pseudogene 1	-1,54		1,57
A_24_P551842	<i>CYTB</i>	Cytochrome b		-2,47	-1,93
A_23_P28772	<i>DBNDD2</i>	Dysbindin (dystrobrevin binding protein 1) domain containing 2	2,33		-2,28
A_33_P3372869	<i>DDX52</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 52	4,10	2,18	-1,88
A_23_P43557	<i>DENND1A</i>	DENN/MADD domain containing 1A	-1,90		2,66
A_21_P0000785	<i>DNM3OS</i>	DNM3 opposite strand/antisense RNA	3,12	1,72	-1,81
A_23_P156852	<i>ECI2</i>	Enoyl-CoA delta isomerase 2	1,75	1,31	-1,34
A_23_P216225	<i>EGR3</i>	Early growth response 3	-18,96	-40,57	
A_23_P136347	<i>EPS8</i>	Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8	3,82	2,65	
A_23_P47410	<i>ESAM</i>	Endothelial cell adhesion molecule	8,93	5,38	
A_23_P400945	<i>ETV3</i>	ets variant 3	-3,28		3,54
A_32_P11471	<i>FAU</i>	Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed	1,30		-1,22
A_33_P3234457	<i>FBRSL1</i>	Fibrosin-like 1	-2,80		2,02
A_23_P42358	<i>FHL5</i>	Four and a half LIM domains 5	8,50	21,13	
A_33_P3798989	<i>FLJ45950</i>	FLJ45950 protein	3,01		-3,16
A_23_P214603	<i>FLOT1</i>	Flotillin 1	1,77		-1,54
A_23_P55319	<i>FLOT2</i>	Flotillin 2	2,11	1,39	-1,52
A_23_P429998	<i>FOSB</i>	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	-106,26	-150,60	
A_23_P38795	<i>FPR1</i>	Formyl peptide receptor 1	-10,55	-6,35	
A_23_P107963	<i>FUT1</i>	Fucosyltransferase 1 (galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase, H blood group)	4,64	3,14	

continua

continuação

Tabela 4 - Lista de genes diferencialmente expressos obtidos a partir de análises de *microarray* de nervos motores de pacientes com ELA, casos bulbares (B) e espinhais (E), e indivíduos-controle (CT)

Nome da Probe	Símbolo do Gene	Nome do Gene	Fold B x CT	Fold E x CT	Fold E x B
A_24_P120934	<i>GADD45G</i> *	Growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma	-5,40	-12,11	
A_23_P212119	<i>GALNT15</i>	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 15	5,63	5,59	
A_33_P3255304	<i>GGT5</i>	Gamma-glutamyltransferase 5	4,62	3,90	
A_23_P1083	<i>GJA4</i>	Gap junction protein, alpha 4, 37kDa	7,11	3,96	
A_23_P254594	<i>GNRH1</i>	Gonadotropin-releasing hormone 1 (luteinizing-releasing hormone)	2,05	3,04	
A_23_P201097	<i>GUK1</i>	Guanylate kinase 1	1,61		-1,38
A_33_P3379391	<i>H2AFJ</i>	H2A histone family, member J		6,77	3,80
A_33_P3224345	<i>HERC2P10</i>	Hect domain and RLD 2 pseudogene 10	-3,41		3,45
A_33_P3399208	<i>HLA-B</i>	Major histocompatibility complex, class I, B	10,32	7,23	
A_33_P3224730	<i>HMCN2</i>	Hemicentin 2	11,04	4,06	
A_19_P00330814	<i>HOTAIR</i>	HOX transcript antisense RNA	7,21	3,62	
A_24_P280983	<i>HOXA11-AS</i>	HOXA11 antisense RNA	6,26	5,56	
A_23_P93772	<i>HOXA5</i>	Homeobox A5	4,33	3,11	
A_21_P0000199	<i>HOXA6</i>	Homeobox A6	5,93	2,58	-2,30
A_23_P70968	<i>HOXA7</i>	Homeobox A7	3,87	3,21	
A_23_P500998	<i>HOXA9</i>	Homeobox A9	11,34	8,62	
A_23_P162355	<i>HOXC5</i>	Homeobox C5	6,51	3,71	
A_33_P3300965	<i>HOXC6</i>	Homeobox C6	9,25	6,09	
A_24_P124558	<i>HOXC8</i>	Homeobox C8	8,23	6,99	
A_23_P25150	<i>HOXC9</i>	Homeobox C9	14,57	13,84	
A_23_P94434	<i>HRCT1</i>	Histidine rich carboxyl terminus 1	6,24	6,34	
A_23_P17287	<i>IAH1</i>	Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog (S. cerevisiae)	1,55		-1,39
A_33_P3423941	<i>IFITM1</i> *	Interferon induced transmembrane protein 1	3,47	1,82	-1,91
A_33_P3242973	<i>IGF2BP2</i>	Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2	-6,68		3,51
A_23_P353035	<i>IGFBP7</i>	Insulin-like growth factor binding protein 7	3,21	1,95	-1,65
A_23_P120227	<i>LBH</i>	Limb bud and heart development	4,26	2,82	
A_23_P128919	<i>LGALS3</i>	Lectin, galactoside-binding, soluble, 3	2,79	2,06	

continua

continuação

Tabela 4 - Lista de genes diferencialmente expressos obtidos a partir de análises de *microarray* de nervos motores de pacientes com ELA, casos bulbares (B) e espinhais (E), e indivíduos-controle (CT)

Nome da Probe	Símbolo do Gene	Nome do Gene	Fold B x CT	Fold E x CT	Fold E x B
A_33_P3354464	<i>LOXLI</i>	Lysyl oxidase-like 1	3,64	2,07	-1,76
A_33_P3356075	<i>LPIN1</i>	Lipin 1	-4,03		3,36
A_33_P3388855	<i>LRPPRC</i>	Leucine-rich pentatricopeptide repeat containing	-2,78		2,98
A_24_P316939	<i>LRRFIP1</i>	Leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1	3,69	2,85	
A_21_P0013035	<i>LSM14A</i>	LSM14A, SCD6 homolog A (S. cerevisiae)	-1,70		2,65
A_33_P3370094	<i>MME</i>	membrane metallo-endopeptidase	-7,41		4,69
A_33_P3311403	<i>MRVII</i>	Murine retrovirus integration site 1 homolog	6,65	6,22	
A_33_P3333527	<i>MSTO1</i>	Misato 1, mitochondrial distribution and morphology regulator	1,42	1,42	
A_33_P3311795	<i>MYB</i>	V-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog	2,45		-2,72
A_23_P23783	<i>MYOC</i>	Myocilin, trabecular meshwork inducible glucocorticoid response	23,86	23,14	
A_23_P113825	<i>NACC2</i>	NACC family member 2, BEN and BTB (POZ) domain containing	-3,75		2,40
A_23_P35848	<i>NADSYN1</i>	NAD synthetase 1	2,23	1,24	-1,80
A_23_P360209	<i>ND3</i>	NADH dehydrogenase, subunit 3 (complex I)	-1,78	-2,69	
A_23_P315252	<i>ND4</i>	NADH dehydrogenase, subunit 4 (complex I)	-1,63	-2,63	
A_24_P120346	<i>NIT2</i>	Nitrilase family, member 2	1,70	1,59	
A_23_P170498	<i>NTAN1</i>	N-terminal asparagine amidase	1,41		-1,28
A_19_P0080399 7	<i>NUP50-AS1</i>	NUP50 antisense RNA 1 (head to head)	1,87		-2,53
A_23_P144465	<i>PAPSS1</i>	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 1	-1,73		2,03
A_23_P110403	<i>PDLIM3</i>	PDZ and LIM domain 3	6,74	2,54	-2,65
A_23_P252471	<i>PECAM1</i>	Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1	5,59	4,20	
A_23_P127367	<i>POLD4</i>	Polymerase (DNA-directed), delta 4, accessory subunit	1,67		-1,45
A_33_P3407742	<i>PPM1B</i>	Protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1B	-2,15		2,03

continua

continuação

Tabela 4 - Lista de genes diferencialmente expressos obtidos a partir de análises de *microarray* de nervos motores de pacientes com ELA, casos bulbares (B) e espinhais (E), e indivíduos-controle (CT)

Nome da Probe	Símbolo do Gene	Nome do Gene	Fold B x CT	Fold E x CT	Fold E x B
A_24_P118011	<i>PRORS DIP</i>	Prolyl-tRNA synthetase associated domain containing 1, pseudogene	4,94	5,36	
A_23_P340848	<i>PTGIR</i>	Prostaglandin I2 (prostacyclin) receptor (IP)	8,71	7,94	
A_23_P22096	<i>PTK2</i>	Protein tyrosine kinase 2	1,52	1,60	
A_23_P53390	<i>PTPRB</i>	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, B	8,19	5,62	
A_21_P0013567	<i>RBPJ</i>	Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region	1,76	1,46	
A_23_P64919	<i>RERGL</i>	RERG/RAS-like	20,67	22,70	
A_23_P46045	<i>RGS5 *</i>	Regulator of G-protein signaling 5	13,83	10,77	
A_23_P341325	<i>RPL10L</i>	Ribosomal protein L10-like	1,56		-1,36
A_23_P217068	<i>RPL12</i>	Ribosomal protein L12	1,74	1,38	-1,26
A_32_P21384	<i>RPL17</i>	Ribosomal protein L17	1,61		-1,45
A_23_P26713	<i>RPL23</i>	Ribosomal protein L23	1,68	1,33	-1,26
A_33_P3295066	<i>RPL23P8</i>	Ribosomal protein L23 pseudogene 8	1,51		-1,32
A_23_P257609	<i>RPL29 *</i>	Ribosomal protein L29	1,73	1,27	-1,36
A_32_P145153	<i>RPL31</i>	Ribosomal protein L31	1,65		-1,41
A_24_P20777	<i>RPL37</i>	Ribosomal protein L37	1,62	1,22	-1,33
A_32_P184796	<i>RPLP0 *</i>	Ribosomal protein, large, P0	2,46		-1,97
A_24_P418619	<i>RPS10 ***</i>	Ribosomal protein S10	1,95		-1,68
A_33_P3357049	<i>RPS15AP10</i>	Ribosomal protein S15a pseudogene 10	2,72		-2,43
A_21_P0011109	<i>RPS27</i>	Ribosomal protein S27	1,62		-1,32
A_23_P23048	<i>S100A9</i>	S100 calcium binding protein A9	-41,23	-40,61	
A_23_P215900	<i>SCARA3</i>	Scavenger receptor class A, member 3	2,55		-2,08
A_33_P3258660	<i>SCD5</i>	Stearoyl-coa desaturase 5	-5,82		3,27
A_33_P3671291	<i>SNORA12</i>	Small nucleolar RNA, H/ACA box 12	3,76	8,29	
A_33_P3358898	<i>SSC5D</i>	Scavenger receptor cysteine rich family, 5 domains	5,02	4,27	
A_23_P429560	<i>SSH1</i>	Slingshot protein phosphatase 1	-3,63		2,15

continua

conclusão

Tabela 4 - Lista de genes diferencialmente expressos obtidos a partir de análises de *microarray* de nervos motores de pacientes com ELA, casos bulbares (B) e espinhais (E), e indivíduos-controle (CT)

Nome da Probe	Símbolo do Gene	Nome do Gene	Fold B x CT	Fold E x CT	Fold E x B
A_23_P319874	<i>TCAIM</i>	T cell activation inhibitor, mitochondrial	3,00		-3,84
A_32_P70315	<i>TIMP4</i>	TIMP metalloproteinase inhibitor 4	7,97	9,57	
A_32_P133840	<i>TMCC2</i>	Transmembrane and coiled-coil domain family 2	-17,94		18,67
A_33_P3282556	<i>TMEM204</i>	Transmembrane protein 204	3,65	2,38	
A_33_P3383866	<i>TREX1</i>	Three prime repair exonuclease 1	2,95	1,95	
A_23_P119857	<i>TTC32</i>	Tetratricopeptide repeat domain 32		2,91	1,90
A_24_P173325	<i>UBA52</i>	Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	1,44		-1,31
A_23_P159663	<i>UXT</i>	Ubiquitously-expressed, prefoldin-like chaperone	1,64		-1,51
A_32_P36313	<i>VTI1A</i>	Vesicle transport through interaction with t-snares 1A	3,36	3,18	
A_21_P0000513	<i>VTRNA1-1</i>	Vault RNA 1-1	4,40		-3,33
A_23_P42288	<i>VWA7</i>	Von Willebrand factor A domain containing 7	-2,33		2,26
A_23_P105562	<i>VWF*</i>	Von Willebrand factor	7,81	6,31	2,36
A_23_P71972	<i>WWOX</i>	WW domain containing oxidoreductase	-3,29		3,70
A_21_P0000158	<i>XPNPEP3</i>	X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P) 3, putative	-3,21		4,65
A_33_P3344204	<i>ZDHHC11**</i>	Zinc finger, DHHC-type containing 11	3,04		-3,72
A_24_P933492	<i>ZDHHC21</i>	Zinc finger, DHHC-type containing 21	-1,67		1,46
A_24_P290354	<i>ZFAND5</i>	Zinc finger, AN1-type domain 5	-6,71	-3,01	
A_23_P27810	<i>ZNF607</i>	Zinc finger protein 607	1,27		-1,51
A_24_P743802	<i>ZNF618</i>	Zinc finger protein 618	-1,77		1,71

Valores positivos e negativos correspondem à regulação para cima e para baixo, respectivamente. *Indica duas, ** três e *** quatro sondas, respectivamente, para o mesmo gene. Os dados foram obtidos por meio da análise ANOVA com pós-teste de Tukey e correção de Benjamini Hochberg com *cut off* de $p < 0,05$.

5.4 Análises enriquecidas para resultados de *Microarray*

5.4.1 Análises enriquecidas para vias do KEGG (Tabela 5)

Tabela 5 - Vias super-representadas para os genes diferencialmente nas análises de pacientes com ELA comparados com os controles e na análise específica comparando os casos de pacientes com ELA espinhais com bulbares

As mesmas vias com os mesmos genes estão presentes em ambas as análises. A significância do enriquecimento (EASE score) foi considerada $p < 0,05$.

ID do Gene	Símbolo do Gene	Nome do Gene
<u>1- Ribosome</u>		
Hs.387208	<i>FAU</i>	Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-musv) ubiquitously expressed
Hs.308332	<i>RPL10L</i>	Ribosomal protein L10-like
Hs.408054	<i>RPL12</i>	Ribosomal protein L12
Hs.374588	<i>RPL17</i>	Ribosomal protein L17
Hs.406300	<i>RPL23</i>	Ribosomal protein L23
Hs.425125	<i>RPL29</i>	Ribosomal protein L29
Hs.469473	<i>RPL31</i>	Ribosomal protein L31
Hs.731513	<i>RPL37</i>	Ribosomal protein L37
Hs.546285	<i>RPLP0</i>	Ribosomal protein, large, P0
Hs.645317	<i>RPS10</i>	Ribosomal protein S10
Hs.546291	<i>RPS27</i>	Ribosomal protein S27
Hs.5308	<i>UBA52</i>	Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1
<u>2- Purine metabolism</u>		
Hs.175473	<i>AKI</i>	Adenylate kinase 1
Hs.28914	<i>APRT</i>	Adenine phosphoribosyltransferase
Hs.376933	<i>GUK1</i>	Guanylate kinase 1
Hs.368610	<i>PAPSS1</i>	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 1
Hs.523829	<i>POLD4</i>	Polymerase (DNA-directed), delta 4, accessory subunit

5.4.2 Análises enriquecidas para *Gene Ontology*

As análises enriquecidas do GO, segundo ANOVA, apontaram as categorias processos biológicos (Tabela 6), componentes celulares (Tabela 7) e funções moleculares (Tabela 8), quando comparados nervo dos pacientes com ELA com os sujeitos-controle:

Tabela 6 - Processos biológicos super-representados pelas análises da plataforma DAVID do nervo de pacientes com ELA comparados com os controles

Número de Termos	Número do GO	Termos	Número de Genes
1	GO:0001501	Skeletal system development	13
2	GO:0006412	Translation	12
3	GO:0006414	Translational elongation	11
4	GO:0007389	Pattern specification process	11
5	GO:0043009	Chordate embryonic development	11
6	GO:0009792	Embryonic development ending in birth or egg hatching	11
7	GO:0009952	Anterior/posterior pattern formation	9
8	GO:0003002	Regionalization	9
9	GO:0048706	Embryonic skeletal system development	7
10	GO:0048705	Skeletal system morphogenesis	7
11	GO:0048568	Embryonic organ development	6
12	GO:0042775	Mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport	4
13	GO:0042773	ATP synthesis coupled electron transport	4
14	GO:0048704	Embryonic skeletal system morphogenesis	4
15	GO:0051646	Mitochondrion localization	3
16	GO:0031532	Actin cytoskeleton reorganization	3

Genes representados em Processos Biológicos				
<i>BMP5</i> (1,4)	<i>HOXA6</i> (1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14)	<i>LPIN1</i> (16)	<i>RPL12</i> (2,3)	<i>RPS27</i> (2,3)
<i>CEBPB</i> (5,6,11)	<i>HOXA7</i> (1,4,5,6,7,8,9,10,11,14)	<i>LRPPRC</i> (15)	<i>RPL17</i> (2,3)	<i>S100A9</i> (16)
<i>CITED2</i> (4,5,6,11)	<i>HOXA9</i> (1,4,5,6,7,8,9)	<i>MSTO1</i> (15)	<i>RPL23</i> (2,3)	<i>UBA52</i> (2,3)
<i>COX1</i> (12,13)	<i>HOXC5</i> (1,4,5,6,7,8,9)	<i>ND3</i> (12, 13)	<i>RPL29</i> (2,3)	<i>UXT</i> (15)
<i>CYTB</i> (12,13)	<i>HOXC6</i> (1,4,5,6,7,8,9,14)	<i>ND4</i> (12,13)	<i>RPL31</i> (2,3)	<i>WWOX</i> (1,10)
<i>EPS8</i> (16)	<i>HOXC8</i> (1,4,7,8,10)	<i>PAPSS1</i> (1)	<i>RPL37</i> (2,3)	<i>ZFAND5</i> (1,5,6,10)
<i>FAU</i> (2,3)	<i>HOXC9</i> (1,4,5,6,7,8,9,10,11)	<i>RBPJ</i> (4,5,6,7,8)	<i>RPLP0</i> (2,3)	
<i>HOXA5</i> (1,4,5,6,7,8,9,10,11,14)	<i>LGALS3</i> (1)	<i>RPL10L</i> (2)	<i>RPS10</i> (2,3)	

Tabela 7 - Componentes celulares super-representados pelas análises da plataforma DAVID do nervo de pacientes com ELA comparados com os controles

Número de Termos	Número do GO	Termos	Número de Genes
1	GO:0005829	Cytosol	18
2	GO:0005840	Ribosome	12
3	GO:0030529	Ribonucleoprotein complex	12
4	GO:0033279	Ribosomal subunit	10
5	GO:0044445	Cytosolic part	10
6	GO:0022626	Cytosolic ribosome	9
8	GO:0022625	Cytosolic large ribosomal subunit	5
9	GO:0022627	Cytosolic small ribosomal subunit	4
10	GO:0015935	Small ribosomal subunit	4

Genes representados em Componentes Celulares

<i>AKI</i> ⁽¹⁾	<i>PTK2</i> ⁽¹⁾	<i>RPL29</i> ^(1,2,3,4,5,6,7,8)	<i>RPS27</i> ^(1,2,3,4,5,6,9,10)
<i>APRT</i> ⁽¹⁾	<i>RPL10L</i> ^(1,2,3,4,5,6,7,8)	<i>RPL31</i> ^(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)	<i>UBA52</i> ^(1,2,3,4,5,6,9,10)
<i>FAU</i> ^(1,2,3,4,5,6,9 10)	<i>RPL12</i> ^(1,2,3)	<i>RPL37</i> ^(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)	<i>UXT</i> ^(1,5)
<i>GUK1</i> ⁽¹⁾	<i>RPL17</i> ^(1,2,3,4,7)	<i>RPLP0</i> ^(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)	
<i>NADSYN1</i> ⁽¹⁾	<i>RPL23</i> ^(1,2,3)	<i>RPS10</i> ^(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)	

Os números entre parênteses indicam os GO Termos dos Componentes Celulares nos quais os genes estão incluídos. A significância do enriquecimento (EASE score) foi considerada $p < 0,01$.

Tabela 8 - Funções moleculares super-representadas pelas análises da plataforma DAVID do nervo de pacientes com ELA comparados com os controles

Número de Termos	Número do GO	Termos	Número de Genes
1	GO:0030528	Transcription regulator activity	20
2	GO:0005198	Structural molecule activity	13
3	GO:0043565	Sequence-specific DNA binding	12
4	GO:0003735	Structural constituent of ribosome	11
5	GO:0016564	Transcription repressor activity	8

Genes representados em Funções Moleculares

<i>CEBPB</i> ^(1,2)	<i>HOXA5</i> ^(1,3)	<i>LRRFIP1</i> ^(1,5)	<i>RPL17</i> ^(2,4)
<i>CIITA</i> ^(1,3,5)	<i>HOXA6</i> ^(1,3)	<i>MYB</i> ⁽¹⁾	<i>RPL23</i> ^(2,4)
<i>CITED2</i> ^(1,5)	<i>HOXA7</i> ^(1,3,5)	<i>MYOC</i> ⁽²⁾	<i>RPL29</i> ^(2,4)
<i>EGR3</i> ⁽¹⁾	<i>HOXA9</i> ^(1,3)	<i>NACC2</i> ^(1,5)	<i>RPL31</i> ^(2,4)
<i>ETV3</i> ^(1,3,5)	<i>HOXC5</i> ^(1,3)	<i>PDLIM3</i> ⁽²⁾	<i>RPL37</i> ^(2,4)
<i>FAU</i> ^(2,4)	<i>HOXC6</i> ^(1,3,5)	<i>RBPJ</i> ⁽¹⁾	<i>RPLP0</i> ^(2,4)
<i>FHL5</i> ⁽¹⁾	<i>HOXC8</i> ^(1,3,5)	<i>RPL10L</i> ^(2,4)	<i>RPS27</i> ^(2,4)
<i>FOSB</i> ^(1,3)	<i>HOXC9</i> ^(1,3)	<i>RPL12</i> ^(2,4)	<i>UBA52</i> ^(1,2,4)

As análises enriquecidas de GO para a análise específica entre os grupos de pacientes com ELA espinhal e ELA bulbar, referente à análise ANOVA com pós-teste de Tukey, apontaram nas categorias para processos biológicos (Tabela 9), componentes celulares (Tabela 10) e funções moleculares (Tabela 11) os seguintes resultados:

Tabela 9 - Processos biológicos super-representados pelas análises da plataforma DAVID do nervo de pacientes com ELA espinhal comparados com os casos de ELA bulbar

Número do termo	Número do GO	Termos	Número de Genes
1	GO:0006412	Translation	12
2	GO:0006414	Translational elongation	11
3	GO:0047497	Mitochondrion transport along microtubule	2
4	GO:0051654	Establishment of mitochondrion localization	2
5	GO:0034643	Mitochondrion localization, microtubule-mediated	2
6	GO:0051646	Mitochondrion localization	2
Genes representados em Processos biológicos			
<i>FAU</i> ^(1,2)	<i>RPL17</i> ^(1,2)	<i>RPL37</i> ^(1,2)	<i>RPS27</i> ^(1,2)
<i>LRPPRC</i> ^(3, 4, 5, 6)	<i>RPL23</i> ^(1,2)	<i>RPLP0</i> ⁽¹⁾	<i>UBA52</i> ^(1,2)
<i>RPL10L</i> ^(1,2)	<i>RPL29</i> ^(1,2)	<i>RPS10</i> ^(1,2)	<i>UXT</i> ^(3, 4, 5, 6)
<i>RPL12</i> ^(1,2)	<i>RPL31</i> ^(1,2)		

Os números entre parênteses indicam os Termos do GO dos Processos Biológicos nos quais os genes estão incluídos. A significância do enriquecimento (EASE score) foi considerada $p < 0,05$.

Tabela 10 - Componentes celulares apresentados como super-representados pelas análises da plataforma DAVID do nervo de pacientes com ELA espinal comparados com os casos bulbar

Número do Termo	Número do GO	Termo	Número de Genes
1	GO:0043228	Non-membrane-bounded organelle	20
2	GO:0043232	Intracellular non-membrane-bounded organelle	20
3	GO:0005829	Cytosol	17
4	GO:0005840	Ribosome	12
5	GO:0030529	Ribonucleoprotein complex	12
6	GO:0033279	Ribosomal subunit	10
7	GO:0044445	Cytosolic part	10
8	GO:0022626	Cytosolic ribosome	9
9	GO:0015934	Large ribosomal subunit	6
10	GO:0022625	Cytosolic large ribosomal subunit	5
11	GO:0022627	Cytosolic small ribosomal subunit	4
12	GO:0015935	Small ribosomal subunit	4
13	GO:0016600	Flotillin complex	2

Genes representados em Componentes Celulares

<i>AKI</i> ⁽³⁾	<i>FLOT2</i> ⁽¹³⁾	<i>NADSYN1</i> ⁽³⁾	<i>RPL23</i> ^(1,2,3,4,5)	<i>RPS10</i> ^(1,2,3,4,5,6,7,8,11,12)
<i>APRT</i> ⁽³⁾	<i>GUK1</i> ⁽³⁾	<i>PDLIM3</i> ^(1,2)	<i>RPL29</i> ^(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10)	<i>RPS27</i> ^(1,2,3,4,5,6,7,8,11,12)
<i>DDX52</i> ^(1,2)	<i>H2AFJ</i> ^(1,2)	<i>RPL10L</i> ^(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10)	<i>RPL31</i> ^(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10)	<i>SSH1</i> ^(1,2)
<i>FAU</i> ^(1,2,3,4,5,6,7,8,11,12)	<i>IGF2BP2</i> ^(1,2)	<i>RPL12</i> ^(1,2,3,4,5)	<i>RPL37</i> ^(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10)	<i>UBA52</i> ^(1,2,3,4,5,6,7,8,11,12)
<i>FLOT1</i> ^(1,2,13)	<i>LRPPRC</i> ^(1,2)	<i>RPL17</i> ^(1,2,3,4,5,6,9)	<i>RPLP0</i> ^(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10)	<i>UXT</i> ^(1,2,3,7)

Os números entre parênteses indicam os GO Termos dos Componentes Celulares nos quais os genes estão incluídos. A significância do enriquecimento (EASE score) foi considerada $p < 0,05$.

Tabela 11 - Funções moleculares apresentados como super-representados pelas análises da plataforma DAVID do nervo de pacientes com ELA espinhal comparados com os casos de ELA bulbar

Número do Termo	Número do GO	Termos	Número de Genes
1	GO:0005198	Structural molecule activity	12
2	GO:0003735	Structural constituent of ribosome	11
3	GO:0003723	RNA binding	10
Genes representados em Funções Moleculares			
<i>DDX52</i> ⁽³⁾	<i>LRPPRC</i> ⁽³⁾	<i>RPL17</i> ^(1,2)	<i>RPL37</i> ^(1,2,3)
<i>FAU</i> ^(1,2,3)	<i>PDLIM3</i> ⁽¹⁾	<i>RPL23</i> ^(1,2)	<i>RPLP0</i> ^(1,2,3)
<i>FLJ45950</i> ⁽³⁾	<i>RPL10L</i> ^(1,2)	<i>RPL29</i> ^(1,2,3)	<i>RPS27</i> ^(1,2)
<i>IGF2BP2</i> ⁽³⁾	<i>RPL12</i> ^(1,2,3)	<i>RPL31</i> ^(1,2,3)	<i>UBA52</i> ^(1,2)

Os números entre parênteses indicam os GO Termos das Funções Moleculares nos quais os genes estão incluídos.

5.4.3 Análise de rede de interação de genes desregulados

Redes de co-expressão desenvolvida por meio da lista de genes diferencialmente expressos entre pacientes ELA comparados com controles, obtida pelo GeneMania. Foram inseridas moléculas pelo Cytoscape para formação de rede de co-expressão. Foi determinado pelo grau de centralidade das moléculas o TOP 15 das moléculas com maior nota fornecido pelo CentiScape e destacadas as 7 moléculas que se apresentaram com alto *degree* e alto *Betweenness* conforme demonstrado na Figura 5.

Figura 7 - Gráfico da dispersão dos 30 genes que apresentaram os maiores valores de *Degree* e *Betweenness*, fornecida pelo programa Cytoscape, segundo a rede de co-expressão comparando ELA *versus* controles. Os losangos escuros referem-se aos genes diferencialmente expressos apontados pela análise estatística, enquanto que os losangos claros se referem aos genes de proteínas que foram incluídas pelo programa Cytoscape.

Figura 8 - Gráfico da dispersão dos 30 genes que apresentaram os maiores valores de *Degree* e *Betweenness* segundo a rede de co-expressão comparando ELA espinhal *versus* ELA bulbar. Os losangos escuros referem-se aos genes diferencialmente expressos apontados pela análise estatística, enquanto que os losangos claros se referem aos genes de proteínas que foram incluídas pelo programa Cytoscape.

5.5 Ensaios de PCR quantitativo (qPCR)

Resultados dos qPCR dos genes avaliados nos nervos motores dos controles, ELA bulbar e ELA espinhal. Genes avaliados: AK1, FAU, RPL29, RPLP0, TMCC2, UBA52 e UXT.

Figura 9 - Gráficos dos resultados de qPCR, em *Fold* relativo, dos genes avaliados nos nervos motores dos indivíduos-controle (CTR), pacientes com esclerose lateral amiotrófica, casos bulbares (B) e espinhais/não bulbares (NB). Foram avaliados os genes *AK1* (A), *FAU* (B), *RPL29* (C), *RPLP0* (D), *TMCC2* (E), *UBA52* (F) e *UXT* (G). Os valores são representados como média ± erro padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ de acordo com o teste ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O presente estudo analisou o perfil de expressão gênica no nervo motor, de pacientes com evolução recente da ELA esporádica, formas bulbar e espinhal, comparados com sujeitos-controle.

A seleção dos pacientes para realização da biópsia do nervo extensor do hálux foi feita com a constatação da funcionalidade preservada do movimento de extensão do hálux, uma vez que, neste estudo, buscou a interpretação dos achados de expressão gênica nos nervos motores num momento de progressão da doença e não após a morte total dos neurônios motores. Com isso, visou, justamente, identificar quais vias estão mais intimamente relacionadas ao processo de modulação da doença, seja de proteção seja, então, de agressão, com vistas à análise do envolvimento das alterações nas ações parácrinas da célula de Schwann sobre os NM.

O banco de dados coletados durante o período do estudo reuniu 448 pacientes acompanhados no Ambulatório de ELA do HC-FMUSP e demonstrou relações epidemiológicas compatíveis com a literatura mundial^{3,89}. A comparação dos fenótipos bulbar e espinhal mostrou diferença quanto à idade de início dos sintomas e da prevalência dos gêneros com significância estatística ($p < 0,0001$) entre os grupos e condizente com a literatura, conforme mostrado na Tabela 2. Outro dado encontrado neste estudo de acordo com a incidência mundial foi a porcentagem dos pacientes bulbares e espinhais (82,4% com início dos sintomas pelos membros, forma espinhal, e 17,6% com início dos sintomas pelo segmento cefálico, forma bulbar)^{89,90}. A relação masculino:feminino de 1,4:1 no total de pacientes, porém, de 1:1,5 nos casos, com fenótipo bulbar. Assim, o predomínio do gênero masculino evidencia-se quando se fala da doença como um todo, ou, mais especificamente, no subtipo espinhal, por esse ser o mais prevalente. Estes achados estão em concordância com a literatura^{89,90}.

Estudos internacionais já demonstram um início de doença numa faixa etária mais elevada no fenótipo bulbar em relação ao fenótipo espinhal em cerca de 5 anos⁹¹. No nosso estudo, verificamos a média de início no fenótipo ELA bulbar em 57 anos (desvio padrão de 12,5 anos e $p < 0,0001$) *versus* ELA espinhal em 51 (desvio padrão de 12,9

anos e $p < 0,0001$) e, finalmente, a porcentagem de ELA familiar foi de 4,9%, também consoante com os dados internacionais³.

Portanto, o perfil de pacientes que acompanham no Ambulatório ELA HC-FMUSP está em conformidade com o que se tem em literatura e, a partir dessa população, é que foram selecionados os pacientes para participarem da biópsia de nervo motor para estudos moleculares. Quando apreciamos a Tabela 2, é possível comprovar que a amostra biopsiada representa a população do Ambulatório ($p > 0,05$), tratando, assim, de uma amostra representativa tanto para os fenótipos como também para idade de início da doença e para os gêneros dos pacientes.

Dessa forma, primeiramente, comparamos os genes expressos de maneira mais significativa e impactante entre doentes *versus* controle e, posteriormente, entre os dois fenótipos de doentes.

A análise do *microarray* apontou 138 genes diferencialmente expressos no nervo motor dos pacientes com ELA em comparação aos controles. A partir desses 138 genes, a plataforma DAVID identificou as categorias funcionais a que esses genes com expressão alterada participam. Este estudo detalhou e discutiu apenas os genes diferencialmente expressos e que tiveram a participação majoritária nas vias descritas pela análise do DAVID.

Fato importante foi o resultado da verificação pela tecnologia da PCRq dos achados dos *microarray*. Dos 7 genes selecionados para esta verificação (AK1; FAU; RPL29; RPLP0; TMCC2; UBA52 e UXT), todos mostraram regulação em linha ao apresentado pelo *microarray*, conforme observado na Figura 9 e Tabela 4. A maioria das publicações científicas envolvendo o *microarray* indicou que *arrays* e qPCR se corroboram qualitativamente⁹². O número de genes validados neste estudo é comparável a outros estudos da literatura^{93,94}.

A análise estendida propiciada pela tecnologia do *microarray* com a verificação posterior pelo PCRq torna-se a análise da expressão gênica reprodutível e sensível, abrindo caminho para a busca de novos alvos terapêuticos com maiores chances de sucesso no que diz respeito à translação dos resultados laboratoriais à prática clínica^{92,93}.

Estudos de expressão gênica são cada vez mais identificados na busca por vias moleculares relacionadas à morte do NM na ELA em diferentes fases da doença, já sendo estudado em material *post-mortem* em pacientes e modelos animais com ELA⁹⁰⁻¹⁰⁴. Alguns estudos focaram na análise da porção lombar da medula espinhal do

animal adulto^{96,100,102,107,109}; enquanto outros se basearam na análise de expressão gênica de tipos celulares específicos por meio da microdissecção a laser de neurônios motores^{98,102,104,108}.

As análises dos mecanismos que desencadeiam a morte do NM na ELA podem incluir avaliação das vias moleculares alteradas nas regiões comumente comprometidas antes do evento da morte do NM, objetivando o encontro dos alvos terapêuticos capazes de prevenir a progressão da doença. Este estudo foi o primeiro que avaliou o perfil de expressão gênica do nervo motor de pacientes portadores de ELA em fases iniciais da doença, especificamente no estágio em que a funcionalidade do segmento sede do nervo biopsiado estava preservada no momento da cirurgia.

Os genes diferencialmente apontados pela avaliação estatística foram submetidos às análises enriquecidas de acordo com as bases de dados KEGG e GO, as quais organizam estes genes em vias e processos biológicos incluídos em bancos de dados fundamentados pelas descrições da literatura. A base de dados GO é largamente utilizada na pesquisa molecular em ELA em diferentes estudos^{95,97,101}. Os termos apontados pela análise do GO evidenciaram processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares que podem ter relação com a ELA.

Após a análise dos resultados do *microarray* neste estudo, conseguimos selecionar alguns genes que tiveram maior significância no que concerne o papel que exercem nos processos biológico, componentes celulares e funções moleculares, ou, então, na hierarquia que ocupam nas redes de sinalização e co-expressão de genes.

A análise da categoria processos biológicos do GO identificou a participação de 38 genes quando a ELA foi comparada aos controles; os genes estão listados na Tabela 6, sendo que eles participam de 16 Termos. Desses dados, destacam-se duas observações: a primeira sobre as subcategorias que possuem o maior número de genes presentes dos 38 encontrados: *Skeletal system development* e *Translation* com, respectivamente, 13 e 12 genes deles; a segunda, quando acerca dos genes que participam do maior numero de subcategorias: HOXA5, HOXA6 e HOXA7, cada um desses participando de 10 subcategorias. Estes 3 genes encontraram-se com suas expressões aumentadas quando comparados ELA *versus* controles na análise do *microarray*. Os genes denominados HOXA são responsáveis pela codificação de uma classe de fatores de transcrição do DNA chamados de *homebox* e exercem papel essencial na regulação da expressão gênica, da morfogênese e da diferenciação

celular¹¹¹. A superexpressão do gene HOXA5 foi identificada como envolvida na prevenção da inflamação pela inibição do TNF α ¹¹². Ou seja, as funções de genes que regulam o processo de expressão gênica como um todo, como um maestro da atividade de todos os genes e a categoria de estrutura física/morfológica da própria célula, são algo essencial para sua preservação e, conseqüentemente, sua funcionalidade.

A análise da plataforma DAVID do nervo motor de pacientes com ELA *versus* controles na categoria Componentes Celulares do GO apontou 10 Termos (subcategorias) com a participação de 18 genes (Tabela 7). Destes, destacam-se os genes FAU e UBA52, tendo ambos a expressão aumentada nas formas bulbares da ELA em comparação às formas espinhais e aos controles que entre si também não mostraram diferenças de expressão gênica significativa. Podemos especular que a expressão aumentada destes genes tenha um papel na fisiopatologia do fenótipo bulbar da doença ELA. O gene FAU com localização cromossomal 11q13.1 é o homólogo celular da *fox sequence* no *Finkel-Biskis-Reilly Murine Sarcoma Virus* (FBR-MuSV) e seu nome é derivado do gene expresso da *FBR-MuSV Associated Ubiquitously*¹¹³. FAU codifica uma proteína de fusão que consiste de 133 aminoácidos. Os 59 aminoácidos no terminal carboxi codificam a proteína ribossômica S30, parte da pequena subunidade do ribossomo. Já a parte amino-terminal da FAU (74 aminoácidos) mostra forte homologia com ubiquitina, uma proteína celular multifuncional 76-amino ácido. A proteína FAU apresenta uma atividade pró-apoptótica¹¹⁴. E o gene UBA52 é responsável por ser um dos precursores da ubiquitina. A ubiquitina é uma proteína nuclear e citoplasmática que tem um papel importante no direcionamento de proteínas celulares para a degradação pelo proteossoma 26S¹¹⁵. E também está envolvido na manutenção da estrutura da cromatina, regulação da expressão genica e resposta ao estresse¹¹⁶.

A análise da categoria Funções Moleculares do GO (Tabela 8), por sua vez, comparando paciente ELA com controles, encontrou 20 genes que participam de 5 Termos, sendo a *Transcription Regulator Activity* o termo com o maior participação de genes (20 genes). E os genes com maior participação das vias são UBA52, HOXA7 e ETV3. Em relação a este último, há evidências de que ele contribui na ação anti-inflamatória da IL10¹¹⁷ e, neste estudo, o gene ETV3 está com a expressão diminuída nos pacientes com ELA bulbar em relação aos pacientes com ELA espinhal e aos controles, não havendo diferença de expressão gênica entre estes dois (Tabela 4). É provável que exerça um papel neurotóxico na fisiopatologia do fenótipo ELA bulbar.

Na sequência, a análise dos Processos biológicos super-representados pela plataforma DAVID do nervo motor dos pacientes com ELA espinhal comparados com os casos bulbares (Tabela 9) apontou a presença de 14 genes que formaram 6 Termos (subcategorias), sendo o *Translation* o Termo com o maior número de genes (12 genes no total). Os genes LRPPRC e UXT tiveram as maiores participações nos Termos, sendo que eles participam de 4 Termos cada um. O gene LRPPRC teve a sua expressão diminuída nos ELA bulbar em relação aos ELA espinhal, porém sem diferença entre os ELA espinhal *versus* controles. LRPPRC e UXT se comportam com suas expressões desreguladas apenas no fenótipo ELA bulbar e sem alterações significativas entre ELA espinhal e controles (Tabela 4). O LRPPRC é descrito na literatura como regulador das moléculas dos citoesqueletos, do tráfego vesicular, da sinalização de citocinas, do transporte nucleocitosólico, da transcrição e da remodelação cromossômica¹¹⁸. Sasarman *et al.* (2010), por sua vez, concluíram que LRPPRC está envolvido na regulação, na estabilidade e no manuseamento de mRNAs maduros¹¹⁹. Ainda, a LRPPRC é capaz de modular a expressão de genes mitocondriais pós-transcrição como parte de um complexo ribonucleoproteico. Ainda, Liu and McKeehan (2002) demonstraram a existência de interação entre o LRPPRC e o UXT, justamente o outro gene em destaque na categoria de Processos Biológicos¹¹⁸. Participa dos mecanismos de fosforilação da ubiquitina, tendo um papel importante na sinalização para degradação proteica¹¹⁸ e, recentemente, o gene UXT foi ligado à manifestação da ELA juvenil¹¹⁹, uma forma de ELA familiar (Quadro 1).

A análise dos Componentes Celulares apresentados como super-representados da plataforma DAVID do nervo de pacientes com ELA espinhal comparados com os casos de ELA bulbar (Tabela 10) apontou 25 genes que compõem 13 Termos, estes predominantemente relacionados ao citosol e ao ribossomo com a participação de genes já presentes em outras funções celulares observado neste estudo, como, por exemplo, os genes AK1, FAU, RPLP0, UBA 52 e UXT.

Destaca-se o papel do gene de expressão da proteína AK1 que catalisa a transferência de um grupo fosfato do ATP para AMP (fosforilação) e desempenha papel essencial na regulação do processo celular, e na monitorização metabólica e energética celular¹²⁰. O AK1 é expresso em tecidos com alta demanda energética como o cérebro, o coração e o músculo esquelético¹²¹. Músculos de camundongos *knockout* para o AK1 exibiram uma reserva energética menor, uma cinética de relaxamento mais lenta e

uma diminuição da tolerância ao estresse metabólico¹²². Neste nosso estudo, encontramos a expressão do gene AK1 aumentada no grupo de pacientes com ELA bulbar em relação aos sujeitos-controle e aos pacientes com ELA espinhal. Estes resultados podem ser interpretados como uma possível via neurotóxica para as formas mais graves da doença. Denota-se o possível papel do AK1 como alvo terapêutico na ELA, uma vez que o trabalho de Hyejin Park, de 2012, demonstrou relação do gene na fisiopatologia da Doença de Alzheimer¹²³, pela hiperfosforilação da proteína Tau¹²⁴ via ativação de cinases, como GSK3 β ¹²⁵. Notavelmente, inibidores da GSK3 β funcionariam como neuroprotetores em doenças neurodegenerativas, devendo ser avaliada na ELA.

Finalmente, quando a plataforma DAVID nas expressões gênicas analisa a categoria de Funções Moleculares da GO do nervo motor de pacientes com ELA espinhal comparados com os casos bulbares, ressaltam-se 16 genes que participam de 3 Termos (Tabela 11). Destaca-se o gene RPL23, que tem papel fundamental no estresse ribossomal, impedindo a biossíntese ribossomal e o crescimento celular via ativação do p53¹²⁶. A expressão gênica da RPL23 aumentou nos pacientes com ELA, tanto a forma bulbar como a espinhal, em relação aos controles. Achado semelhante foi descrito por Yu Chen *et al.*, em 2015, em um estudo que demonstrou a regulação positiva do gene na degeneração do disco intervertebral¹²⁷.

Há relatos que a inibição da transcrição do RNA ribossômico (RNAr) culmina no processo de apoptose dos neurônios¹²⁸ e, também, recentemente, foi verificada a alteração da transcrição do RNAr em pacientes com doença de Alzheimer¹²⁹. A interrupção da transcrição do RNAr coincide com o aumento de proteínas RPL23 no citoplasma, que acabam por se ligarem à ligase MDM2-ubiquitina que, por sua vez, ativa a p53, iniciando, assim, a cascata de eventos que resultam na apoptose. Descreve-se este processo como mecanismo eficaz na eliminação de células incapazes de sintetizar proteínas de forma eficiente devido a defeitos de biogênese do ribossomo¹³⁰.

O gene RPL37, por sua vez, tem papel importante nesta categoria de Funções Moleculares, já que inibe a ação do MDM2 em degradar o p53, que, ao aumentar de número, sinaliza a célula para vias de morte celular¹³¹. Estes achados podem ser interpretados como mecanismo relacionado à progressão da doença.

Este estudo encontrou expressão aumentada do gene RPL37 no nervo motor dos pacientes com ELA *versus* controles. Em uma comparação entre os fenótipos da ELA,

houve expressão aumentada do gene na ELA bulbar em relação à ELA espinhal, o que poderia estar correlacionado com a maior gravidade da doença.

Portanto, os genes que tiveram sua expressão aumentada nos pacientes portadores de ELA comparados com os controles e sem diferença entre os fenótipos bulbar e espinhal foram: HOXA5, HOXA7 e EPS8. Estes se comportam neste estudo como possíveis marcadores na fisiopatologia da doença ELA em relação às pessoas saudáveis e possíveis alvos terapêuticos.

Os genes que apresentaram a expressão aumentada somente no fenótipo bulbar da ELA foram: FAU, UBA52, UXT e 2AK1. Ou seja, estes genes estavam com a expressão aumentada quando comparados os pacientes ELA bulbares com aqueles portadores da forma espinhal da doença e, também, ELA bulbar *versus* controles, porém sem diferença quando comparadas as formas espinhal *versus* controles. Deste modo, este grupo de genes desregulados da forma bulbar poderia corresponder a possíveis alvos terapêuticos deste fenótipo da ELA.

Notavelmente, os genes ETV3 e LRPPRC teriam relação com o fenótipo bulbar por estarem com a sua expressão gênica diminuída em relação aos outros subgrupos estudados.

Por fim, a sinalização dos genes HOXA6, RPL12, RPL23, RPL29 e RPL37 pode ter impacto na ELA, devido à expressão aumentada deles quando comparados aos casos controles. Contudo, estes genes, também, se mostraram desregulados nas comparações da forma bulbar *versus* forma espinhal, indicando a possibilidade dos mecanismos celulares que participam da topografia inicial de apresentação da doença (resumidos no Quadro 6).

Quadro 6 - Genes com a expressão desregulada específica para cada grupo estudado

Expressão aumentada para ELA <i>versus</i> controles	HOXA5	HOXA7	EPS8		
Expressão aumentada somente para ELA bulbar	FAU	UBA52	UXT	AK1	
Expressão diminuída somente para ELA bulbar	ETV3	LRPPRC			
Expressão aumentada para ELA <i>versus</i> controles e, ao mesmo tempo, para ELA bulbar <i>versus</i> ELA espinhal	HOXA6	RPL12	RPL23	RPL29	RPL37

Autores também utilizam a base de dados KEGG¹³² para identificar vias super-representadas baseadas em genes diferencialmente expressos apontados pelas análises de *microarray*^{133,134}. KEGG é a base de dados que integra as informações funcionais do genoma, oferecendo a vantagem de ser fundamentada no conhecimento das interações moleculares e das redes de reações do metabolismo, do processamento de informações genéticas, em processos celulares, em doenças humanas e em desenvolvimento de fármacos⁷². A análise do KEGG neste estudo apontou vias que podem estar relacionadas à ELA. Duas vias foram encontradas, *Ribosome (Genetic Information Processing)* e *Purine Metabolism (Metabolism)*, tanto quando comparados ELA *versus* controles como quando comparados ELA espinhal *versus* ELA bulbar (Tabela 5). A análise aponta para a possível participação parácrina do ribossomo na ELA, e, consequentemente, a alteração na síntese proteica na fisiopatologia da ELA.

Como a maior parte do RNA extraído do nervo periférico vem das células de Schwann, poder-se-ia inferir que estas células gliais periféricas exerceriam ação parácrina de toxicidade e/ou neuroproteção à degeneração dos NM a depender do estado trófico do neurônio em questão. Estes achados abrem perspectiva futura para desenvolvimento de alvos pela ação direta na expressão gênica ou mesmo por meio das suas vias de sinalização, estimulando a proteção neuronal ou mesmo freando processos que estejam acelerando a doença.

Os ribossomos são organelas celulares formadas por complexo macromolecular que asseguram a síntese proteica por meio da informação genética que lhes chega do RNA mensageiro. Os ribossomos reúnem as vinte moléculas específicas de aminoácidos para formar proteínas determinadas por sequências de moléculas de RNA¹³⁵.

As proteínas ribossomais são, assim, componentes essenciais do processo de tradução celular para a formação de proteínas e polipeptídeos, entretanto, estas proteínas indicam ter funções ribossomais adicionais, tais como a sinalização de eventos de estresse^{136,137}. Por exemplo, a proteína RPL12 está envolvida na autorregulação do *splicing* do RNAm em *Caenorhabditis elegans*¹³⁸, processo essencial para formação de RNAm maduro e saudável. O aumento da expressão do gene responsável por esta proteína pode estar relacionado, por mecanismo compensatório, a uma possível via de reparo na formação das proteínas mal-formadas em doenças neurodegenerativas, o que eleva a importância dos achados da regulação da RPL12 apontados neste estudo.

Estudo anterior mostrou regulação aumentada da RPL12 na esclerose múltipla, indicando uma maior ativação na via de tradução celular¹³⁹. Ainda, estudo adicional indicou a importância da RPL12 na resposta celular à injúria em células de vegetais¹⁴⁰.

Há de se ressaltar que as interações moleculares permitem o funcionamento celular no seu conjunto, bem como, em relação as suas respostas à lesão e à neuroproteção. O delineamento das interações ainda está longe de ser elucidado, a despeito do desenvolvimento acelerado de novas ferramentas para o estudo delas⁷³.

As proteínas raramente atuam sozinhas e suas funções tendem a ser reguladas. Muitos processos moleculares dentro de uma célula são realizados por máquinas moleculares que são construídas a partir de um grande número de componentes de proteínas organizados por suas interações proteína-proteína. Essas interações formam as chamadas interações do organismo e, quando aberrantes, são a base de múltiplas doenças relacionadas à agregação, como Creutzfeldt-Jakob¹⁴¹ e doença de Alzheimer¹⁴². Disto posto, a despeito da ELA predominar nos NM superiores e inferiores, a doença é cada vez mais caracterizada como uma doença sistêmica, o que dificultaria ainda mais a definição de alvos terapêuticos efetivos fundamentados em análises exclusivas de um ou outro tecido ou de uma região do corpo.

As redes de co-expressão de genes apresentadas neste estudo mostram gráficos não direcionados, em que cada nó corresponde a um gene e um par de nós está conectado com uma borda se houver uma relação de co-expressão significativa entre eles¹⁴³. Tendo perfis de expressão gênica de vários genes para várias amostras ou condições experimentais, uma rede de co-expressão de genes pode ser construída procurando por pares de genes que mostram um padrão de expressão semelhante em amostras. As redes de co-expressão de genes são de interesse biológico, uma vez que os genes co-expressados são controlados pelo mesmo programa regulatório de transcrição, funcionalmente relacionado ou membros do mesmo caminho ou complexo proteico¹⁴⁴.

Neste estudo, a rede de co-expressão desenvolvida por meio da lista de genes diferencialmente expressos do nervo extensor curto do hálux de pacientes com ELA comparados com os controles, obtida pelo GeneMania, encontrou 7 genes que se apresentavam entre os 15 maiores *Betweenness* e os 15 maiores *Degree*, conforme demonstrado na Figura 7; são eles: RPS18, FXYD5, RPL19, RPL29, UBA52 e EPS8. Desses, destacam-se a função do RPL29 e do EPS8.

A expressão do gene RPL29, no atual trabalho, mostrou um regulação aumentada para o mesmo quando comparados pacientes com ELA *versus* controles, achado oposto publicado em literatura num estudo de expressão gênica em modelo animal realizado pela pesquisadora Pamela Shaw em 2010⁹². A proteína RPL29 desempenha papel na regulação negativa da apoptose celular, por participar dos processos de interações célula-célula e célula-matriz, e estar envolvida na regulação das interações entre fatores de crescimento e seus receptores¹⁴⁵; a diminuição da proteína mudaria as interações sinalizando a célula à apoptose¹⁴⁶. É possível que os resultados da publicação com modelo animal de ELA, em que a RPL29 diminuiu nos neurônios motores, achado discordante deste nosso estudo, talvez se explique pelo tipo de célula, na qual a regulação esteja ocorrendo. No nosso estudo, há grande possibilidade dos achados corresponderem às células de Schwann do nervo periférico, estando a regulação aumentada relacionada ao efeito neuroprotetor em resposta ao estado de lesão deflagrado pela ELA, visando inibir os processos que levem à morte celular, ao contrário da cascata degenerativa em que se encontram os próprios neurônios motores na ELA. Além disso, há a diferença no momento da doença que as análises foram realizadas, no estudo de Shaw e colaboradores, isto ocorreu numa fase terminal da doença, enquanto que, em nosso trabalho, abordou as fases iniciais da ELA.

O gene EPS8, que teve a sua expressão aumentada na ELA (tanto forma bulbar como espinal) em relação aos controles, apresentou alto valor de *Betweenness* e de *Degree* na rede de co-expressão, exercendo, assim, papel importante na hierarquia dos genes relacionados à doença (Figura 7). O EPS8 é uma proteína envolvida no remodelamento da actina (proteína que forma os microfilamentos), controla a densidade das espinhas dendríticas e plasticidade sináptica que se alteram em várias doenças neurológicas¹⁴⁷, relação estabelecida com a ELA agora neste trabalho.

Finalmente, a rede de co-expressão a partir da lista de genes diferencialmente expressos do nervo de pacientes com ELA espinal comparados com ELA bulbar (Figura 8) apontou o gene FAU, já analisado neste estudo, como tendo importância relativa dentre as moléculas desreguladas, com maior valor de *Betweenness* e de *Degree*, sendo um preditor mais importante da transcrição proteica quando comparamos as duas formas clínicas de ELA estudadas neste trabalho.

Assim, o uso da metodologia de *microarray* na avaliação da expressão gênica do nervo motor de pacientes portadores de ELA no início da doença consolida-se como ferramenta valiosa na compreensão dos mecanismos de sinalização dessa patologia complexa.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- 1- A análise epidemiológica realizada durante este estudo, registrada pelo Banco de Dados Informatizado, demonstrou que o perfil de pacientes do Ambulatório de ELA do HC-FMUSP está condizente com os achados mundiais e, ainda, que a amostra de pacientes biopsiados, que tiveram seus genes analisados quanto à expressão gênica, representa a população dos pacientes com ELA.
- 2- As análises do *microarray* apontaram 138 genes diferencialmente expressos nos nervos dos pacientes com ELA bulbar, ELA espinhal e controles.
- 3- As análises bioinformáticas apontaram 17 vias super-representadas quando comparados ELA com controles, sendo majoritariamente pertencentes a via do Ribossomo.
- 4- Alterações na expressão gênica no nervo motor abrem as possibilidades para que disfunções na unidade célula de Schwann/Neurônio Motor possam contribuir para o processo neurodegenerativo. De particular interesse, alterações em genes relacionados às vias moleculares de sinalização neurotrófica, apoptose, metabolismo proteico e guiamento sináptico mostram a participação dos componentes periféricos na fisiopatologia da ELA e poderão ser objeto de futuros estudos para desenvolvimento de novos alvos terapêuticos utilizados em ensaios clínicos.

8 ANEXOS

8.1 Anexo A - Escala ALFRS

ALS Functional Rating Scale

- a. Fala
 - 4 Normal
 - 3 Disartria leve
 - 2 Disartria moderada, fala inteligível
 - 1 Disartria grave, necessita comunicação não verbal
 - 0 Anartria
- b. Salivação
 - 4 Normal
 - 3 Excesso leve, pode haver sialorréia à noite ou no decúbito
 - 2 Excesso moderado, sialorréia mínima
 - 1 Excesso grave, sialorréia evidente
 - 0 Salorréia intensa, necessita aspiração constante
- c. Deglutição
 - 4 Normal
 - 3 Disfagia leve, ocasionalmente engasga
 - 2 Disfagia moderada, necessita mudança na quantidade ou consistência
 - 1 Disfagia grave, necessita sonda
 - 0 Dieta parenteral ou por gastrostomia
- d. Escrita
 - 4 Normal
 - 3 Lentificada, todas as palavras são legíveis
 - 2 Algumas palavras ilegíveis
 - 1 Capaz de manipular caneta mas incapaz de escrever
 - 0 Incapaz de manipular
- e. Manipulação de alimentos e utensílios (pacientes sem gastrostomia)
 - 4 Normal
 - 3 Lento mas não necessita de ajuda
 - 2 Lento e necessita de ajuda
 - 1 Necessita de terceiros para os utensílios, mas pode alimentar-se sozinho
 - 0 Necessita ser alimentado
- e.1. Manipulação de alimentos e utensílios (pacientes com gastrostomia)
 - 4 Normal
 - 3 Lento mas capaz de todas as manipulações sem auxílio
 - 2 Necessita algum auxílio
 - 1 Praticamente toda a manipulação da dieta necessita de auxílio
 - 0 Incapaz/necessita de auxílio total

- f. Vestuário e higiene
- 4 Normal
 - 3 independente para todas as atividades, mas c/ dificuldade e eficiência diminuída
 - 2 Necessita assistência intermitente ou p/ tarefas específicas
 - 1 Necessita assistência total
 - 0 Totalmente dependente
- g. Atitude no leito e manipulação roupa de cama
- 4 Normal
 - 3 Lento mas não necessita de ajuda
 - 2 Pode mexer-se e ajustar roupa sem auxílio, mas com grande dificuldade
 - 1 Pode iniciar tais atividades, mas necessita auxílio para terminá-las
 - 0 Depende de auxílio total
- h. Marcha
- 4 Normal
 - 3 Alterações precoces
 - 2 Necessita de auxílio
 - 1 Restrito cadeira rodas ou leito
 - 0 Paraplégico
- i. Subir escadas
- 4 Normal
 - 3 Lento
 - 2 Perda equilíbrio ou fadiga
 - 1 Necessita assistência
 - 0 Incapaz
- j. Respiração
- 4 Normal
 - 3 Dispnéia com esforço leve (andar/falar)
 - 2 Dispnéia ao repouso
 - 1 Assistência ventilatória intermitente (noturna)
 - 0 Dependente ventilador

ESCORE:

8.2 Anexo B - Cópia do parecer de aprovação no Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CaPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0187/11

Título: "CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DA CÉLULA DE SCHWANN NO PROCESSO DE NEURODEGENERAÇÃO DO NEURÔNIO MOTOR NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA NO MODELO ANIMAL TRANSGÊNICO E NO NERVO PERIFÉRICO DE PACIENTES."

Pesquisador Responsável: Gerson Chadi

Pesquisador Executante: Chrystian Junqueira Alves

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Departamento: NEUROLOGIA

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA *ad-referendum*** em 18/11/2011, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

• Carta datada de 04/10/2011 - Inclusão do pesquisador executante Dr. Frederico Mennucci de Haidar Jorge.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) a elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 18 de Novembro de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

8.3 Anexo C - Escala MRC (do inglês *Medical Research Council*)

Escala de Avaliação da Força Muscular
(MRC-Medical Research Council)

0	Não se percebe nenhuma contração
1	Traço de contração, sem produção do movimento
2	Contração fraca, produzindo movimento com a eliminação da gravidade
3	Realiza movimento contra a gravidade, porém sem resistência adicional
4	Realiza movimento contra a resistência externa moderada e gravidade
5	É capaz de superar maior quantidade de resistência que o nível anterior

8.4 Anexo D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para biópsia de nervo periférico

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M. ☐ F. ☐
DATA DE NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº: APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD(.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M. ☐ F. ☐
DATA DE NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº: APTO:
CEP: TELEFONE: DDD(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Caracterização do papel da Célula de Schwann no processo de neurodegeneração do neurônio motor na Esclerose Lateral Amiotrófica no modelo animal transgênico e no nervo periférico de pacientes.

PESQUISADORES : Profs. Drs. Gerson Chadi, Dagoberto Callegaro e Angelina Maria Martins Lino.

CARGO/FUNÇÃO: Docentes. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 53368 (Gerson Chadi), 13066 (Dagoberto Callegaro) e 65341 (Angelina Maria Martins Lino).

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Neurologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☒ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Você está sendo convidado por ter sido diagnosticado com Esclerose Lateral Amiotrófica. Nós estamos realizando uma pesquisa em que iremos verificar novos mecanismos envolvidos na neurodegeneração (morte da célula nervosa) na doença Esclerose Lateral Amiotrófica. Para esse fim, iremos colher um fragmento do Nervo Extensor Curto do Hálux (um pequeno nervo que contribui para levantar o dedão do pé) por meio de uma biópsia deste nervo na região superficial do peito de um dos pés. A coleta será realizada no Centro Cirúrgico da Neurocirurgia Funcional do Ipq-HCFMUSP por profissional especializado. Esta biópsia será feita com aplicação de anestésico local e incisão de 3cm na pele do peito do pé próximo ao hálux (dedão do pé). O nervo encontra-se logo abaixo da pele e, após seu encontro, um fragmento de 2cm do mesmo será retirado. Em seguida será feito o fechamento da pele (sutura) e curativo local. As complicações imediatas do procedimento podem ser dor, pode ficar inchado (hematoma ou edema) no local da biópsia, porém de pequena intensidade e passageiros. Como é feito na região do pé, podem acontecer algumas vezes infecção que, se presente, será tratado com antibióticos. Havendo dor, anti-inflamatórios e analgésicos poderão ser introduzidos. A retirada dos pontos será feita após 10 dias no Ambulatório de Esclerose Lateral Amiotrófica. O fragmento do seu nervo que retirado será então enviado ao nosso laboratório para as análises.

Autorizo que o material colhido e não utilizado nessa pesquisa seja armazenado por tempo superior a 5 anos no Banco de DNA do Departamento de Neurologia para pesquisas futuras devidamente aprovadas pelo Conselho do Departamento de Neurologia e CAPPEQS da FMUSP, garantindo sempre que os dados de estudos futuros serão confidenciais, sigilosos e privados e serão utilizados apenas para pesquisas. Este estudo não trará benefícios imediatos para você, entretanto acreditamos que seja importante para o conhecimento da doença e eventualmente no futuro possa vir a ajudar outros pacientes que tenham o diagnóstico igual ao da sua doença.

A sua participação nesta pesquisa é totalmente voluntária e o seu tratamento e acompanhamento não serão modificados caso você não aceite participar desta pesquisa. Além disso, as análises efetuadas e resultados obtidos nesta pesquisa também não modificarão o seu tratamento e acompanhamento habitual.

Você poderá ter acesso em qualquer momento às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas. Você terá direito de tirar seu consentimento em qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo à continuidade da assistência que recebe. Os dados deste estudo serão utilizados apenas para pesquisa, de modo que a identidade dos pacientes não será revelada. Em caso de intercorrências, você poderá entrar em contato com os Drs. Gerson Chadi, Angelina Martins Lino ou Dagoberto Callegaro, do Depto de Neurologia, FMUSP, no LIM-45, na AV. Dr Arnaldo, nº 455, 2º andar, sala 2119, Cerqueira César, CEP: 01246-903; Telefone: 3061-7460.

Acredito ter sido suficientemente esclarecido (a) a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que

minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data __/__/__

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data __/__/__

8.5 Anexo E - Banco de Dados Informatizado para registro da evolução clínica dos pacientes com ELA acompanhados no Ambulatório de ELA do HCFMUSP

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMATICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório: Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend.: 1281894 01/04/2016 Tipo Atend.: Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Tópico: GERAL ANTECEDENTES PESSOAIS ANTECEDENTES FAMILIARES

1º Segmento Acometido: MS ☐ Direito ☐ Esquerdo
 1º Segmento acometido: MI ☐ Direito ☐ Esquerdo
 1º segmento acometido: ☐ Cefálico

Data de início:
 Idade no 1º sintoma:

Progressão:

Uso de BIPAP: ☐ Sim ☐ Não
 Apoio Unilateral: ☐ Sim ☐ Não
 Apoio Bilateral: ☐ Sim ☐ Não
 Cadeira de Rodas: ☐ Sim ☐ Não
 Restrito ao Leito: ☐ Sim ☐ Não
 Câmbrias: ☐ Ausentes ☐ Presentes
 Disfagia: ☐ Ausentes ☐ Presentes
 Disfonia: ☐ Ausentes ☐ Presentes
 Sintomas Depressivos: ☐ Ausentes ☐ Presentes
 Alteração de Comportamento: ☐ Ausentes ☐ Presentes
 Sintomas Cognitivos: ☐ Ausentes ☐ Presentes

Detalhar:

Amb. Atend. Data
 ELA Consulta 01/04/2016
 ENFTRI Consulta 01/04/2016
 ENFTRI Consulta 01/04/2016
 ENFTRI Consulta 31/03/2016
 ENFTRI Consulta 31/03/2016

Prontuário S13 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMATICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório: Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend.: 1281894 01/04/2016 Tipo Atend.: Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Tópico: GERAL ANTECEDENTES PESSOAIS ANTECEDENTES FAMILIARES

Hábitos ☐ Tabagismo ☐ Ex - Tabagismo ☐ Sedentarismo
☐ Etilismo ☐ Ex - Etilismo Outros

Neoplásicos ☐ Outros

Endócrinas ☐ Diabetes ☐ Hipertroidismo ☐ Hipotroidismo ☐ Outros

Circulatórias ☐ AVC isquêmico ☐ AVC hemorrágico ☐ HAS ☐ Infarto
☐ Tromb. Arterial ☐ Tromb. Venosa ☐ Outros

Respiratórias ☐ Asma ☐ DPOC ☐ Outros

Digestivas ☐ Outros

Cutâneas ☐ Outros

Renais ☐ Insuf. Renal aguda ☐ Insuf. Renal crônica ☐ Outros

SNC ☐ Outros

Amb. Atend. Data
 ELA Consulta 01/04/2016
 ENFTRI Consulta 01/04/2016
 ENFTRI Consulta 01/04/2016
 ENFTRI Consulta 31/03/2016
 ENFTRI Consulta 31/03/2016

Prontuário S13 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMÁTICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório: Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend.: 1281894 01/04/2016 Tipo Atend.: Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Tópico
GERAL
ANTECEDENTES PESSOAIS
▶ ANTECEDENTES FAMILIARES

Doença neurodegenerativa ☐ Sim ☐ Não

Ative Windows
Go to Settings to activate Windows.

Prontuário SI3 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMÁTICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório: Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend.: 1281894 01/04/2016 Tipo Atend.: Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Tópico
▶ Nível de consciência
Movimentos do Pescoço
Movimentos da Cintura Escap.
Movimentos do Braço | Antebr.
Movimentos da Mão e Punho
Movimento do Quadril/Joeelho
Movimentos do Pé | Dedos

Descritivo:

Nível de Consciência:
☐ Consciente ☐ Orientado ☐ Colaborativo

Ative Windows
Go to Settings to activate Windows.

Prontuário SI3 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMATICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend. 1281894 01/04/2016 Tipo Atend. Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Tópico

- Nível de consciência
- Movimentos do Pescoço
- Movimentos da Cintura Escap.
- Movimentos do Braço | Antebr.
- Movimentos da Mão e Punho
- Movimento do Quadril/Joeelho
- Movimentos do Pé | Dedos

Flexão - Mm esternodeomastóides bilaterais ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Extensão - Mm trapézio ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Rotação lateral - Mm esternodeomastóide unilateral ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Inclinação lateral sem rotação - Mm escalenos ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Amb. Atend. Data

- ELA Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 31/03/2016
- ENFTRI Consulta 31/03/2016

Prontuário S13 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMATICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend. 1281894 01/04/2016 Tipo Atend. Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Tópico

- Nível de consciência
- Movimentos do Pescoço
- Movimentos da Cintura Escap.
- Movimentos do Braço | Antebr.
- Movimentos da Mão e Punho
- Movimento do Quadril/Joeelho
- Movimentos do Pé | Dedos

Elevação - Mm trapézio (fibras sup. e médias - popal elevador) e levantador da escápula ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Protração (abdução) - M serrátil anterior ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Amb. Atend. Data

- ELA Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 31/03/2016
- ENFTRI Consulta 31/03/2016

Prontuário S13 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMÁTICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend. 1281894 01/04/2016 Tipo Atend. Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Tópico

- Nível de consciência
- Movimentos do Pescoço
- Movimentos da Cintura Escap.
- Movimentos do Braço | Antebraço
- Movimentos da Mão e Punho
- Movimento do Quadril/Joeiro
- Movimentos do Pé | Dedos

BRAÇO

Abdução - Mm deltóide e supraespinhoso ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Adução - Mm peitorais maiores e grande dorsal ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

ANTEBRAÇO

Flexão - Mm bíceps, braquial e braquiorradial ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Extensão - Mm tríceps ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☒ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Supinação - Mm bíceps, braquiorradial e supinador ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Pronação - Mm pronador redondo e quadrado ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Ative Windows

Go to Settings to activate Windows.

Prontuário S13 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMÁTICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend. 1281894 01/04/2016 Tipo Atend. Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Tópico

- Nível de consciência
- Movimentos do Pescoço
- Movimentos da Cintura Escap.
- Movimentos do Braço | Antebraço
- Movimentos da Mão e Punho
- Movimento do Quadril/Joeiro
- Movimentos do Pé | Dedos

Movimentos dos 4 dedos:

Flexão das falanges DISTAIS = Mm flexor profundo dos dedos: ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Flexão das falanges MÉDIAS = Mm flexor superficial dos dedos: ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Flexão das falanges PROXIMAIS = Mm lumbricais e interósseas: ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Adução e abdução dos dedos = Mm interósseos (palmares fazem adução e dorsais fazem abdução): ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Flexão, abdução e oposição do dedo mínimo (nervo ulnar): ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Extensão de dedo mínimo e indicador (n. radial) = Mm extensor do dedo mínimo e do índice: ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Movimentos do Polegar:

Extensão da falange DISTAL - PROXIMAL = Mm flexor longo do polegar (n. radial) ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

= Mm flexor curto do polegar (n. radial): ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Flexão da falange DISTAL - PROXIMAL = Mm flexor longo do polegar (n. mediano) ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

= Mm flexor curto do polegar: ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Adução do polegar = Mm adutor do polegar (n. ulnar): ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Oposição do polegar = Mm oponente do polegar (n. mediano): ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Ative Windows

Go to Settings to activate Windows.

Prontuário S13 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMÁTICA Idade: 72 anos e 9 meses

Ambulatório Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend. 1281894 01/04/2016 Tipo Atend. Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HOMED

Tópico

Nível de consciência

Movimentos do Pescoço

Movimentos da Cintura Escapu.

Movimentos do Braço | Antebr.

Movimentos da Mão e Punho

Movimento do Quadril/Joelho

Movimentos do Pé | Dedos

Movimentos do quadril:

Flexão da coxa - Mm psosas e ilíaco: ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Extensão da coxa - Mm glúteo máximo: ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Abdução da coxa - Mm glúteo médio e mínimo, periforme,sartório e tensor da fáscia lata: ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Adução da coxa - Mm adutores longo, curto e magno ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Movimentos do Joelho:

Flexão da perna - Mm bíceps femoral, semimembranoso, semitendíneo, poplíteo, sartório e gastrocnêmio: ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Extensão da perna - Mm quadríceps femoral (reto femoral, vasto lateral, médio e intermédio): ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Amb. Atend. Data

► ELA Consulta 01/04/2016

ENFTRI Consulta 01/04/2016

ENFTRI Consulta 01/04/2016

ENFTRI Consulta 31/03/2016

ENFTRI Consulta 31/03/2016

Activate Windows
Go to Settings to activate Windows.

Prontuário S13 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HOMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMÁTICA Idade: 72 anos e 9 meses

Ambulatório Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend. 1281894 01/04/2016 Tipo Atend. Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HOMED

Tópico

Nível de consciência

Movimentos do Pescoço

Movimentos da Cintura Escapu.

Movimentos do Braço | Antebr.

Movimentos da Mão e Punho

Movimento do Quadril/Joelho

Movimentos do Pé | Dedos

Movimentos do pé:

Dorsiflexão do pé - M tibial anterior: ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Flexão planta do pé - M tríceps sural (sóleo e gastrocnêmio) e plantar: ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Movimentos dos dedos:

Flexão dos dedos - Mm flexores longo e curto dos dedos, e mm flexores longo e curto do hálux: ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Extensão dos dedos - Mm extensores longo e curto dos dedos, e extensores longo e curto do hálux: ☐ FG0 ☐ FGI ☐ FGII ☐ FGIII ☐ FGIV ☐ FGV

Amb. Atend. Data

► ELA Consulta 01/04/2016

ENFTRI Consulta 01/04/2016

ENFTRI Consulta 01/04/2016

ENFTRI Consulta 31/03/2016

ENFTRI Consulta 31/03/2016

Activate Windows
Go to Settings to activate Windows.

Prontuário S13 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HOMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMÁTICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório: Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend.: 1281894 01/04/2016 Tipo Atend.: Médico Administrador Prontmed Assistente: Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Tópico

- Aviões da Face
- Membros Superiores / Inferiores
- Tônus / Trofismo
- Fasciculações / Coordenação

Orbicular das pálpebras: ☐ Presente = + ☐ Vivo = ++ ☐ Exaltado = +++ ☐ Abolido = 0

Orbicular dos lábios: ☐ Presente = + ☐ Vivo = ++ ☐ Exaltado = +++ ☐ Abolido = 0

Mandibular: ☒ Presente = + ☐ Vivo = ++ ☐ Exaltado = +++ ☐ Abolido = 0

Palmo-mental: ☐ Presente = + ☐ Vivo = ++ ☐ Exaltado = +++ ☐ Abolido = 0

Amb. Atend. Data

- ELA Consulta 01/04/2016
- ENFTR1 Consulta 01/04/2016
- ENFTR1 Consulta 01/04/2016
- ENFTR1 Consulta 31/03/2016
- ENFTR1 Consulta 31/03/2016

Prontuário S13 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMÁTICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório: Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend.: 1281894 01/04/2016 Tipo Atend.: Médico Administrador Prontmed Assistente: Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Tópico

- Aviões da Face
- Membros Superiores / Inferiores
- Tônus / Trofismo
- Fasciculações / Coordenação

Membros Superiores:

Triapital: ☐ Presente = + ☐ Vivo = ++ ☐ Exaltado = +++ ☐ Diminuídos = - ☐ Abolido = 0

Bicipital: ☐ Presente = + ☐ Vivo = ++ ☐ Exaltado = +++ ☐ Diminuídos = - ☐ Abolido = 0

Extensão - Radial: ☐ Presente = + ☐ Vivo = ++ ☐ Exaltado = +++ ☐ Diminuídos = - ☐ Abolido = 0

Flexão dos dedos: ☐ Presente = + ☐ Vivo = ++ ☐ Exaltado = +++ ☐ Diminuídos = - ☐ Abolido = 0

Cúbito e Radiopronador: ☐ Presente = + ☐ Vivo = ++ ☐ Exaltado = +++ ☐ Diminuídos = - ☐ Abolido = 0

Membros Inferiores:

Adutor das coxas: ☐ Presente = + ☐ Vivo = ++ ☐ Exaltado = +++ ☐ Diminuídos = - ☐ Abolido = 0

Patelar: ☐ Presente = + ☐ Vivo = ++ ☐ Exaltado = +++ ☐ Diminuídos = - ☐ Abolido = 0

Aquileu: ☐ Presente = + ☐ Vivo = ++ ☐ Exaltado = +++ ☐ Diminuídos = - ☐ Abolido = 0

Cutâneo-plantar - Sinal de Babinski: ☐ Presente ☐ Ausente

Amb. Atend. Data

- ELA Consulta 01/04/2016
- ENFTR1 Consulta 01/04/2016
- ENFTR1 Consulta 01/04/2016
- ENFTR1 Consulta 31/03/2016
- ENFTR1 Consulta 31/03/2016

Prontuário S13 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMÁTICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend. 1281894 01/04/2016 Tipo Atend. Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Tópico

- Áreas da Face
- Membros Superiores / Inferiores
- Tônus / Trofismo**
- Fasciculações / Coordenação

Tônus

MSD: ☐ Hipotônico ☐ Hipertônico ☐ Normal

MSE: ☐ Hipotônico ☐ Hipertônico ☐ Normal

MID: ☐ Hipotônico ☐ Hipertônico ☐ Normal

MIE: ☐ Hipotônico ☐ Hipertônico ☐ Normal

Língua: ☐ Hipotônico ☐ Hipertônico ☐ Normal

Trofismo

MSD: ☐ Eutrófico ☐ Hipotrófico ☐ Hipertrófico

MSE: ☐ Eutrófico ☐ Hipotrófico ☐ Hipertrófico

MID: ☐ Eutrófico ☐ Hipotrófico ☐ Hipertrófico

MIE: ☐ Eutrófico ☐ Hipotrófico ☐ Hipertrófico

Língua: ☐ Eutrófico ☐ Hipotrófico ☐ Hipertrófico

Amb. Atend. Data

- ELA Consulta 01/04/2016
- ENFTR1 Consulta 01/04/2016
- ENFTR1 Consulta 01/04/2016
- ENFTR1 Consulta 31/03/2016
- ENFTR1 Consulta 31/03/2016

Prontuário S13 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMÁTICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend. 1281894 01/04/2016 Tipo Atend. Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Tópico

- Áreas da Face
- Membros Superiores / Inferiores
- Tônus / Trofismo
- Fasciculações / Coordenação**

Fasciculação

MSD: ☐ Presentes ☐ Ausentes

MSE: ☐ Presentes ☐ Ausentes

MID: ☐ Presentes ☐ Ausentes

MIE: ☐ Presentes ☐ Ausentes

Língua: ☐ Presentes ☐ Ausentes

Coordenação

☐ Preservada ☐ Alterada

Sensibilidade

☐ Preservada ☐ Alterada ☐ Superficial ☐ Profunda

Nervos cranianos

☐ Preservados ☐ Alterados ☐ VII ☐ IX e X ☐ XII

Amb. Atend. Data

- ELA Consulta 01/04/2016
- ENFTR1 Consulta 01/04/2016
- ENFTR1 Consulta 01/04/2016
- ENFTR1 Consulta 31/03/2016
- ENFTR1 Consulta 31/03/2016

Prontuário S13 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMÁTICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend. 1281894 01/04/2016 Tipo Atend. Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

MEEM(30):

Orientação: Temporal(5) Espacial(5) Memória imediata(3) Atenção e cálculo(5) Evocação(3)

Linguagem: Nomear(2) Repetição(1) Comando verbal(3) Leitura(1) Escrita(1) Desenho(1)

Bateria Breve: Percepção(10) Nomeação(10) Memória incidental(10) Memória imediata1 (10) Memória imediata2(10) Memória tardia(10)

Digit span: Ordem direta Ordem indireta

Fluência fonêmica: (palavras com "p")

Fluência semântica: (animais)

Vigilância: ☐ Sim ☐ Não

Erros: ☐ Sim ☐ Não

Ative Windows

Go to Settings to activate Windows.

Prontuário S13 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMÁTICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend. 1281894 01/04/2016 Tipo Atend. Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Hemograma completo:

VSH:

PCR:

TGO:

GGT:

LDH:

Vit B12:

Ac. Fólico:

CPK:

HTLV:

Úrea:

Creatinina:

Eletrólitos (Na, K, Cl, Ca, PO4):

Ative Windows

Go to Settings to activate Windows.

Prontuário S13 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMÁTICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend. 1281894 01/04/2016 Tipo Atend. Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Vit B12:			
Ac. Fólico:			
CPK:			
HTLV:			
Úreia:			
Creatinina:			
Eletrolitos (Na, K, Cl, Ca, PO4):			
Glicose:			
Eletroforese Proteínas:			
Imunoeletroforese:			
BNMG:			
Prova Função Pulmonar:			
TC ou RNM neuro-eixo:			

Amb. Atend. Data

- ELA Consulta 01/04/2016
- ENFTR1 Consulta 01/04/2016
- ENFTR1 Consulta 01/04/2016
- ENFTR1 Consulta 31/03/2016
- ENFTR1 Consulta 31/03/2016

Prontuário S13 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMÁTICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend. 1281894 01/04/2016 Tipo Atend. Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Tópico

- GERAL
- ALS FR

	Força (0-5)	Tônus	Trofismo	Reflexo	Fasciculações
MSD prox:					
MSD distal:					
MSE prox:					
MSE distal:					
MID prox:					
MID distal:					
MIE prox:					
MIE distal:					
Seg. Cefálica:					

Amb. Atend. Data

- ELA Consulta 01/04/2016
- ENFTR1 Consulta 01/04/2016
- ENFTR1 Consulta 01/04/2016
- ENFTR1 Consulta 31/03/2016
- ENFTR1 Consulta 31/03/2016

Prontuário S13 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMÁTICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório: Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend.: 1281894 01/04/2016 Tipo Atend.: Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HOMED

Tópico
GERAL
▶ ALS FR

Adicionar Coluna
Excluir Coluna
Exportar Tabela Para Excel

DATA
A - Fala
B - Salvação
C - Deglutição
D - Escreita
E - Manipulação de alimentos e utensílios (sem GTM)
E1 - Manipulação de alimentos e utensílios (pacientes com GTM)
F - Vestuário e higiene
G - Atitude no leito e manipulação roupa de cama
H - Marcha
I - Subir escadas
J - Respiração
Escore total

Amb. Atend. Data
▶ ELA Consulta 01/04/2016
ENFTRI Consulta 01/04/2016
ENFTRI Consulta 01/04/2016
ENFTRI Consulta 31/03/2016
ENFTRI Consulta 31/03/2016

Prontuário SI3 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HOMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMÁTICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório: Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend.: 1281894 01/04/2016 Tipo Atend.: Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HOMED

Tópico
▶ Diagnóstico de ELA
Formas Clínicas
Diagnóstico de DLFT
Amiotrofia Muscular Progressiva
ELP
Atrofia Monomérica
Doença de Kennedy
Outros

Diagnóstico de ELA Confirmado em

Critérios diagnósticos EL Escorial Revisado

☐ ELA clinicamente definida
Sinais NMS e NMI em três regiões

☐ ELA clinicamente definida - apoiada por laboratório
Sinais NMS e/ou NMI em uma região e o paciente é portador de mutação genética

☐ ELA clinicamente provável
Sinais NMS e NMI em duas regiões com sinais NMS rostral aos sinais NMI

☐ ELA clinicamente provável com apoio laboratório
Sinais NMS em uma ou mais regiões e sinais NMI definido por EMG em ao menos duas regiões

☐ ELA clinicamente possível
Sinais de NMS e NMI em uma região
Sinais de NMS em duas regiões
Sinais NMS e NMI em duas regiões com NMS não rostral ao NMI

Amb. Atend. Data
▶ ELA Consulta 01/04/2016
ENFTRI Consulta 01/04/2016
ENFTRI Consulta 01/04/2016
ENFTRI Consulta 31/03/2016
ENFTRI Consulta 31/03/2016

Prontuário SI3 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HOMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMÁTICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend.: 1281894 01/04/2016 Tipo Atend.: Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Tópico

- Diagnóstico de ELA
- Formas Clínicas
- Diagnóstico de DLFT
- Amiotrofia Muscular Progressiva
- ELP
- Atrofia Monomérica
- Doença de Kennedy
- Outros

☐ ELA Clássica
☐ Forma pseudo polineuropática (Patrikus)
☐ "Hail - Arm Syndrome"
☐ Paralisia Bulbar Progressiva

Amb. Atend. Data

- ELA Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 31/03/2016
- ENFTRI Consulta 31/03/2016

Prontuário SI3 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMÁTICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend.: 1281894 01/04/2016 Tipo Atend.: Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Tópico

- Diagnóstico de ELA
- Formas Clínicas
- Diagnóstico de DLFT
- Amiotrofia Muscular Progressiva
- ELP
- Atrofia Monomérica
- Doença de Kennedy
- Outros

☐ Diagnóstico de DLFT confirmado em ____/____/____

Critério de DFT: características diagnósticas centrais

☐ Distúrbios do comportamento:

- ☐ Início insidioso e progressão lenta
- ☐ Perda precoce da consciência social (negligência com higiene pessoal)
- ☐ Perda precoce da consciência social (ausência de tato social, desvios da conduta social)
- ☐ Sinais precoces de desinibição (como hipersexualidade, comportamento violento, jocosidade)
- ☐ Rigidez mental e inflexibilidade
- ☐ Hiperoralidade (mudanças na dieta, excesso alimentares, consumo excessivo de álcool e tabaco, exploração oral dos objetos)
- ☐ Comportamento estereotipado e perseverativo (comportamento errante, maneirismo como bater palmas, cantar, dançar, preocupação ritualística como colecionismo, hábitos de higiene íntima e vestuário)
- ☐ Comportamento de utilização (exploração irrestrita de objetos no ambiente)
- ☐ Distratibilidade, impulsividade e falta de persistência
- ☐ Perda precoce do insight e da crítica de que as alterações são secundárias a uma alteração no próprio estado mental

☐ Sintomas afetivos:

- ☐ Depressão, ansiedade, sentimentalismo excessivo, ideação suicida, delírios (presentes precocemente e efêmeros)

Amb. Atend. Data

- ELA Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 31/03/2016
- ENFTRI Consulta 31/03/2016

Prontuário SI3 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMÁTICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend. 1281894 01/04/2016 Tipo Atend. Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Tópico

- Diagnóstico de ELA
- Formas Clínicas
- Diagnóstico de DLFT
- Amiotrofia Muscular Progressiva
- ELP
- Atrofia Monomérica
- Doença de Kennedy
- Outros

☐ Sintomas afetivos:

- ☐ Depressão, ansiedade, sentimentalismo excessivo, ideação suicida, delírios (presentes precocemente e efêmeros)
- ☐ Hipocondria, preocupação somática bizarra (precoces e efêmeros)
- ☐ Indiferença emocional (ausência de empatia e simpatia, apatia)
- ☐ Perda da mímica (inércia e falta de espontaneidade)

☐ Distúrbio da fala:

- ☐ Redução progressiva da fala (redução das manifestações verbais espontâneas)
- ☐ Fala estereotipada (repetição de repertório limitado de palavras, frases e temas)
- ☐ Ecolalia e perseveração
- ☐ Mutismo tardio

☐ Orientação espacial e prexia preservadas (habilidades intactas para interagir com o ambiente)

☐ Sintomas físicos

- ☐ Reflexos primitivos precoces
- ☐ Incontinência precoce
- ☐ Acinesia (tardia), rigidez, tremor
- ☐ Pressão sanguínea baixa e lábil

☐ Investigações complementares

Amb. Atend. Data

- ELA Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 31/03/2016
- ENFTRI Consulta 31/03/2016

Prontuário SI3 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMÁTICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend. 1281894 01/04/2016 Tipo Atend. Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Tópico

- Diagnóstico de ELA
- Formas Clínicas
- Diagnóstico de DLFT
- Amiotrofia Muscular Progressiva
- ELP
- Atrofia Monomérica
- Doença de Kennedy
- Outros

☐ Investigações complementares

- ☐ EEG normal apesar de demência clinicamente evidente
- ☐ Exame de imagem (estrutural ou funcional, ou ambos) evidenciando anormalidade predominantemente frontal ou temporal anterior, ou frontotemporal
- ☐ Exame neuropsicológico alterado (graves prejuízos nos testes do lóbulos frontais, na ausência de amnésia significativa, afasia, ou distúrbio espacial)

☐ Características que dão suporte ao diagnóstico

- ☐ Início antes dos 65 anos
- ☐ História familiar positiva de distúrbio similar em parente de primeiro grau
- ☐ Paralisia bulbar, fraqueza muscular, fasciculações (doença do neurônio motor)

☐ Características incompatíveis com diagnósticos (critérios de exclusão):

- ☐ Início abrupto com eventos ictais
- ☐ Trauma de crânio relacionado ao início dos sintomas
- ☐ Amnésia precoce e importante
- ☐ Desorientação espacial precoce, desorientação em ambientes familiares, dificuldades para localizar objetos
- ☐ Apraxia precoce e importante
- ☐ Fala logodíscica, com perda rápida da associação das ideias
- ☐ Micromias
- ☐ Déficit cortical bulbar ou medular
- ☐ Ataxia cerebelar
- ☐ Coreoatetose

Amb. Atend. Data

- ELA Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 31/03/2016
- ENFTRI Consulta 31/03/2016

Prontuário SI3 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMÁTICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend. 1281894 01/04/2016 Tipo Atend. Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Tópico

- Diagnóstico de ELA
- Formas Clínicas
- Diagnóstico de DLFT
- Amiotrofia Muscular Progressiva
- ELP
- Atrofia Monomérica
- Doença de Kennedy
- Outros

☐ Características que dão suporte ao diagnóstico

- ☐ Início antes dos 65 anos
- ☐ História familiar positiva de distúrbio similar em parente de primeiro grau
- ☐ Paralisia bulbar, fraqueza muscular, fasciculações (doença do neurônio motor)

☐ Características incompatíveis com diagnósticos (critérios de exclusão):

- ☐ Início abrupto com eventos ictais
- ☐ Trauma de crânio relacionado ao início dos sintomas
- ☐ Amnésia precoce e importante
- ☐ Desorientação espacial precoce, desorientação em ambientes familiares, dificuldades para localizar objetos
- ☐ Apraxia precoce e importante
- ☐ Palsia logodônica, com perda rápida da associação das idéias
- ☐ Mioclonias
- ☐ Déficit cortical bulbar ou medular
- ☐ Ataxia cerebelar
- ☐ Coreoatetose
- ☐ EEG significativamente anormal em estágios iniciais da doença
- ☒ Exame de imagem com alterações estruturais ou funcionais predominantemente em estruturas pós-centrais; Lesões multifocais na TC ou RNM de crânio
- ☐ Testes laboratoriais indicando envolvimento cerebral ou doença inflamatória (como esclerose múltipla, sífilis, AIDS e encefalite herpética)

Amb. Atend. Data

- ELA Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 31/03/2016
- ENFTRI Consulta 31/03/2016

Prontuário S13 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMÁTICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend. 1281894 01/04/2016 Tipo Atend. Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Tópico

- Diagnóstico de ELA
- Formas Clínicas
- Diagnóstico de DLFT
- Amiotrofia Muscular Progressiva
- ELP
- Atrofia Monomérica
- Doença de Kennedy
- Outros

☐ Amiotrofia Muscular Progressiva Confirmado em / / ?

Amb. Atend. Data

- ELA Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 31/03/2016
- ENFTRI Consulta 31/03/2016

Prontuário S13 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMATICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend. 1281894 01/04/2016 Tipo Atend. Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Tópico

- Diagnóstico de ELA
- Formas Clínicas
- Diagnóstico de DLFT
- Amiotrofia Muscular Progressiv
- ELP
- Atrofia Monomérica
- Doença de Kennedy
- Outros

☐ Esclerose Lateral Primária (Pringle): Confirmado em ____ ?

Amb. Atend. Data

- ELA Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 31/03/2016

Prontuário S13 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Activate Windows
Go to Settings to activate Windows.

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMATICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend. 1281894 01/04/2016 Tipo Atend. Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Tópico

- Diagnóstico de ELA
- Formas Clínicas
- Diagnóstico de DLFT
- Amiotrofia Muscular Progressiv
- ELP
- Atrofia Monomérica
- Doença de Kennedy
- Outros

☐ Atrofia Monomérica (Doença de Hirayama): Confirmado em ____ ?

Amb. Atend. Data

- ELA Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 31/03/2016

Prontuário S13 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Activate Windows
Go to Settings to activate Windows.

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMATICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório: Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend.: 1281894 01/04/2016 Tipo Atend.: Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Tópico

- Diagnóstico de ELA
- Formas Clínicas
- Diagnóstico de DLFT
- Amiotrofia Muscular Progressiva
- ELP
- Atrofia Monomélica
- Doença de Kennedy**
- Outros

☐ Doença de Kennedy: Confirmado em

Amb. Atend. Data

- ELA Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 31/03/2016
- ENFTRI Consulta 31/03/2016

Prontuário S13 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Activate Windows
Go to Settings to activate Windows.

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMATICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório: Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend.: 1281894 01/04/2016 Tipo Atend.: Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Tópico

- Diagnóstico de ELA
- Formas Clínicas
- Diagnóstico de DLFT
- Amiotrofia Muscular Progressiva
- ELP
- Atrofia Monomélica
- Doença de Kennedy
- Outros**

Outros: Confirmado em

Descrição:

Amb. Atend. Data

- ELA Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 01/04/2016
- ENFTRI Consulta 31/03/2016
- ENFTRI Consulta 31/03/2016

Prontuário S13 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Activate Windows
Go to Settings to activate Windows.

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMATICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório: Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend.: 1281894 01/04/2016 Tipo Atend.: Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

☐ RILUZOL ☐ Vit. E ☐ B2D

☐ IRSS ☐ Complexo B ☐ L-Carnitina ☐ TO

☐ Dual ☐ Neuroléptico ☐ Baclofeno ☐ FONIO

☐ Triciclo ☐ Zolpidem ☐ Fisioterapia Motora ☐ Fisioterapia Respiratória

Amb. Atend. Data

► ELA Consulta 01/04/2016

ENFTRI Consulta 01/04/2016

ENFTRI Consulta 01/04/2016

ENFTRI Consulta 31/03/2016

ENFTRI Consulta 31/03/2016

Prontuário S13 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Activate Windows
Go to Settings to activate Windows.

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMATICA Idade: 72 anos e 9 meses Ambulatório: Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend.: 1281894 01/04/2016 Tipo Atend.: Médico Administrador Prontmed Assistente Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HCMED

Amb. Atend. Data

► ELA Consulta 01/04/2016

ENFTRI Consulta 01/04/2016

ENFTRI Consulta 01/04/2016

ENFTRI Consulta 31/03/2016

ENFTRI Consulta 31/03/2016

Prontuário S13 Visualizar Prontuário Salvar Salvar e Fechar Cancelar Atendimento Solicitar Suporte CID 10 APAC HCMED

Último Acesso: Última Atualização: Versão 15.3.2

Activate Windows
Go to Settings to activate Windows.

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMATICA Idade: 72 anos e 9 meses

Ambulatório: Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend.: 1281894 01/04/2016

Tipo Atend.:

Médico: Administrador Prontmed

Assistente: Administrador Prontmed

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HOMED

A - DNA (Banco de DNA)

A.1 TDP-43 ☐ Sim ☐ Não

A.2 OUTROS ☐ Sim ☐ Não

B - Biopsia do nervo ☐ Sim ☐ Não

C - Biopsia da raiz ventral ☐ Sim ☐ Não

D - Corno anterior pós-mortem ☐ Sim ☐ Não

E - Psicológico ☐ Sim ☐ Não

F - Fonoaudiológico ☐ Sim ☐ Não

G - Fisioterapêutico ☐ Sim ☐ Não

H - Prova de função Pulmonar ☐ Sim ☐ Não

I - Outros

Amb. Atend. Data

► ELA Consulta 01/04/2016

ENFTRL Consulta 01/04/2016

ENFTRL Consulta 01/04/2016

ENFTRL Consulta 31/03/2016

ENFTRL Consulta 31/03/2016

Activate Windows

Prontuário S13

Visualizar Prontuário

Salvar

Salvar e Fechar

Cancelar Atendimento

Solicitar Suporte

CID 10

APAC

HOMED

Último Acesso:

Última Atualização:

Versão 15.3.2

Serviço de Neurologia do HCFMUSP - Atendimento Clínico

Paciente: 55519939G - TESTE DA INFORMATICA Idade: 72 anos e 9 meses

Ambulatório: Esclerose Lateral Amiotrófica

Atend.: 1281894 01/04/2016

Tipo Atend.:

Médico: Administrador Prontmed

Assistente: Camila Galvão Lopes

História Exame Neurológico Reflexos EXAME COGNITIVO Exames Complementares Resumo Motor Diagnóstico Tratamento Conduta Protocolo de pesquisa - exames HOMED

Filtro: Digite o nome/sigla do exame:

* SIQH-LAB

Observação

Amb. Atend. Data

► ELA Consulta 01/04/2016

ENFTRL Consulta 01/04/2016

ENFTRL Consulta 01/04/2016

ENFTRL Consulta 31/03/2016

ENFTRL Consulta 31/03/2016

Activate Windows

Prontuário S13

Visualizar Prontuário

Salvar

Salvar e Fechar

Cancelar Atendimento

Solicitar Suporte

CID 10

APAC

HOMED

Último Acesso:

Última Atualização:

Versão 15.3.2

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

1. Pasinelli P, Brown RH. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosc.* 2006 Sep; 7(9):710-23.
2. Charcot JM, Joffroy A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lesion de la substance grise et des faisceaux antero-lateraux de la moelle epiniere. *Arch Physiol Neurol Path.* 1869;2:744-54.
3. Chiò A, Logroscino G, Traynor BJ, Collins J, Simeone JC, Goldstein LA, White LA. Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology.* 2013;41(2):118-30.
4. Turner MR, Hardiman O, Benatar M, Brooks BR, Chio A, de Carvalho M, Ince PG, Lin C, Miller RG, Mitsumoto H, Nicholson G, Ravits J, Shaw PJ, Swash M, Talbot K, Traynor BJ, Van den Berg LH, Veldink JH, Vucic S, Kiernan MC. Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurology.* 2013;12(3):310-22.
5. Redler RL, Dokholyan NV. The complex molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2012;107:215-62.
6. Bede P, Hardiman O. Longitudinal structural changes in ALS: a three time-point imaging study of white and gray matter degeneration. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2017 Dec 7:1-10.
7. Shaw PJ. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005 Aug;76(8):1046-57.
8. Ince PG, Lowe J, Shaw PJ. Amyotrophic lateral sclerosis: current issues in classification, pathogenesis and molecular pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1998 Apr;24(2):104-17.
9. Morgan BR, Zitzewitz JA, Massi F. Structural rearrangement upon fragmentation of the stability core of the ALS-linked protein TDP-43. *Biophys J.* 2017 Aug 8;113(3):540-9.
10. Tan CF, Eguchi H, Tagawa A, Onodera O, Iwasaki T, Tsujino A, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. TDP-43 immunoreactivity in neuronal inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis with or without SOD1 gene mutation. *Acta Neuropathol.* 2007 May;113(5):535-42.
11. Oh J, An JW, Oh SI, Oh KW, Kim JA, Lee JS, Kim SH. Socioeconomic costs of amyotrophic lateral sclerosis according to staging system. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2015 Jun;16(3-4):202-8.

12. Schepelmann K, Winter Y, Spottke AE, Claus D, Grothe C, Schröder R, Heuss D, Vielhaber S, Mylius V, Kiefer R, Schrank B, Oertel WH, Dodel R. Socioeconomic burden of amyotrophic lateral sclerosis, myasthenia gravis and facioscapulohumeral muscular dystrophy. *J Neurol*. 2010 Jan;257(1):15-23.
13. Worms PM. The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. *J Neurol Sci*. 2001;191(1-2):3-9.
14. Leigh PN, Ray-Chaudhuri K. Motor neuron disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994 Aug;57(8):886-96.
15. Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*. 2001; 344: 1688–1700.
16. Wijesekera LC, Leigh PN. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis*. 2009 Feb 3;4:3.
17. Giancarlo Logroscino BJ, Traynor OH, Adriano C, Douglas M, Robert JS, Andrea M, Emma B, Ettore B. Incidence of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010 April; 81(4): 385–390.
18. Dengler R, Konstanzer A, Küther G, Hesse S, Wolf W, Struppler A. Amyotrophic lateral sclerosis: macro-EMG and twitch forces of single motor units. *Muscle Nerve*. 1990 Jun;13(6):545-50.
19. Sobue G, Sahashi K, Takahashi A, Matsuoka Y, Muroga T, Sobue I. Degenerating compartment and functioning compartment of motor neurons in ALS: possible process of motor neuron loss. *Neurology*. 1983 May;33(5):654-7.
20. Kraemer M, Buerger M, Berlit P. Diagnostic problems and delay of diagnosis in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg*. 2010 Feb;112(2):103-5.
21. Turner MR, Kiernan MC, Leigh PN, Talbot K. Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol*. 2009 Jan;8(1):94-109.
22. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2000 Dec;1(5):293-9.
23. Krarup C. Lower motor neuron involvement examined by quantitative electromyography in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol*. 2011 Feb;122(2):414-22.
24. de Carvalho M, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J, Mills K, Mitsumoto H, Nodera H, Shefner J, Swash M. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clin Neurophysiol*. 2008;119(3):497–503.
25. Ludolph AC, Jesse S. Evidence-based drug treatment in amyotrophic lateral sclerosis and upcoming clinical trials. *Ther Adv Neurol Disord*. 2009 Sep;2(5):319-26.

26. Benatar M. Lost in translation: treatment trials in the SOD1 mouse and in human ALS. *Neurobiol. Dis.* 2007;26(1):1–13.
27. Rothstein JD. Of mice and men: reconciling preclinical ALS mouse studies and human clinical trials. *Ann. Neurol.* 2003;53(4):423-6.
28. Ferraiuolo L, Kirby J, Grierson AJ, Sendtner M, Shaw PJ. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2011 Nov;7(11):616-30.
29. Pasinelli P, Brown RH. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Sep;7(9):710-23. Review.
30. Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol.* 2009 Dec 14;187(6):761-72.
31. Derave W, Van Den Bosch L, Lemmens G, Eijnde BO, Robberecht W, Hespel P. Skeletal muscle properties in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis: effects of creatine treatment. *Neurobiol Dis.* 2003 Aug;13(3):264-72.
32. Dupuis L, Oudart H, René F, Gonzalez de Aguilar JL, Loeffler JP. Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jul 27;101(30):11159-64.
33. Mahoney DJ, Kaczor JJ, Bourgeois J, Yasuda N, Tarnopolsky MA. Oxidative stress and eparinal enzyme upregulation in SOD1-G93A mouse skeletal muscle. *Muscle Nerve.* 2006 Jun;33(6):809-16.
34. Echaniz-Laguna A, Zoll J, Ponsot E, N'guessan B, Tranchant C, Loeffler JP, Lampert E. Muscular mitochondrial function in amyotrophic lateral sclerosis is progressively altered as the disease develops: a temporal study in man. *Exp Neurol.* 2006 Mar;198(1):25-30.
35. Krasnianski A, Deschauer M, Neudecker S, Gellerich FN, Müller T, Schoser BG, Krasnianski M, Zierz S. Mitochondrial changes in skeletal muscle in amyotrophic lateral sclerosis and other neurogenic eparin. *Brain.* 2005 Aug;128(Pt 8):1870-6.
36. Vielhaber S, Winkler K, Kirches E, Kunz D, Büchner M, Feistner H, Elger CE, Ludolph AC, Riepe MW, Kunz WS. Visualization of defective mitochondrial function in skeletal muscle fibers of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 1999 Oct 31;169(1-2):133-9.
37. Comi GP, Bordoni A, Salani S, Franceschina L, Sciacco M, Prella A, Fortunato F, Zeviani M, Napoli L, Bresolin N, Moggio M, Ausenda CD, Taanman JW, Scarlato G. Cytochrome c oxidase subunit I microdeletion in a patient with motor neuron disease. *Ann Neurol.* 1998 Jan;43(1):110-6.

38. Corti S, Donadoni C, Ronchi D, Bordoni A, Fortunato F, Santoro D, Del Bo R, Lucchini V, Crugnola V, Papadimitriou D, Salani S, Moggio M, Bresolin N, Comi GP. Amyotrophic lateral sclerosis linked to a novel SOD1 mutation with muscle mitochondrial dysfunction. *J Neurol Sci.* 2009 Jan 15;276(1-2):170-4.
39. Baker DJ, Blackburn DJ, Keatinge M, Sokhi D, Viskaitis P, Heath PR, Ferraiuolo L, Kirby J, Shaw PJ. Lysosomal and phagocytic activity is increased in astrocytes during disease progression in the SOD1 (G93A) mouse 126 eparin 126 amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci.* 2015 Oct 15;9:410.
40. Lino MM, Schneider C, Caroni P. Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J Neurosci.* 2002 Jun 15;22(12):4825-32.
41. Gong YH, Parsadanian AS, Andreeva A, Snider WD, Elliott JL. Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *J Neurosci.* 2000 Jan 15;20(2):660-5.
42. Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillée S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH Jr, Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science.* 2003 Oct 3;302(5642):113-7.
43. Boillée S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science.* 2006 Jun 2;312(5778):1389-92.
44. Peterson JF, Aggarwal N, Smith CA, Gollin SM, Surti U, Rajkovic A, Swerdlow SH, Yatsenko SA. Integration of *microarray* analysis into the clinical diagnosis of hematological malignancies: how much can we improve cytogenetic testing? *Oncotarget.* 2015 Aug 7; 6(22):18845–62.
45. Schaefer AM, Sanes JR, Lichtman JW. A compensatory subpopulation of motor neurons in a mouse eparin amyotrophic lateral sclerosis. *J Comp Neurol.* 2005 Sep 26;490(3):209-19.
46. Gould TW, Buss RR, Vinsant S, Prevette D, Sun W, Knudson CM, Milligan CE, Oppenheim RW. Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *J Neurosci.* 2006 Aug 23;26(34):8774-86.
47. Boillée S, Vande Velde C, Cleveland DW. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron.* 2006 Oct 5;52(1):39-59. Review.
48. Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci.* 2007 May;10(5):615-22.

49. Yamanaka K, Boillee S, Roberts EA, Garcia ML, McAlonis-Downes M, Mikse OR, Cleveland DW, Goldstein LS. Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 May 27;105(21):7594-9.
50. Alves CJ, de Santana LP, dos Santos AJ, de Oliveira GP, Duobles T, Scorisa JM, Martins RS, Maximino JR, Chadi G. Early motor and electrophysiological changes in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis and gender differences on clinical outcome. *Brain Res*. 2011 Jun 7;1394:90-104.
51. Keller AF, Gravel M, Kriz J. Live imaging of amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis: disease onset is characterized by marked induction of GFAP in Schwann cells. *Glia*. 2009 Aug 1;57(10):1130-42.
52. Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA, Glass JD. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol*. 2004 Feb;185(2):232-40.
53. Gordon T, Hegedus J, Tam SL. Adaptive and maladaptive motor axonal sprouting in aging and motoneuron disease. *Neurol Res*. 2004 Mar;26(2):174-85.
54. De Winter F, Vo T, Stam FJ, Wisman LA, Bär PR, Niclou SP, van Muiswinkel FL, Verhaagen J. The expression of the chemorepellent Semaphorin 3A is selectively induced in terminal Schwann cells of a subset of neuromuscular synapses that display limited anatomical plasticity and enhanced vulnerability in motor neuron disease. *Mol Cell Neurosci*. 2006 May-Jun;32(1-2):102-17.
55. Cozzolino M, Pesaresi MG, Gerbino V, Grosskreutz J, Carri MT. Amyotrophic lateral sclerosis: new insights into underlying molecular mechanisms and opportunities for therapeutic intervention. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Nov 1;17(9):1277-330.
56. Kanda T, Tsukagoshi H, Oda M, Miyamoto K, Tanabe H. Changes of unmyelinated nerve fibers in sural nerve in amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Acta Neuropathol*. 1996;91(2):145-54.
57. Kerkhoff H, Jennekens FG, Troost D, Veldman H. Nerve growth factor receptor immunostaining in the spinal cord and peripheral nerves in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 1991;81(6):649-56.
58. Turner BJ, Cheah IK, Macfarlane KJ, Lopes EC, Petratos S, Langford SJ, Cheema SS. Antisense peptide nucleic acid-mediated knockdown of the p75 neurotrophin receptor 127 epar motor neuron disease in 127 eparin SOD1 transgenic mice. *J Neurochem*. 2003 Nov;87(3):752-63.
59. Cheah IK, Cheema SS, Langford SJ, Lopes EC, Macfarlane KJ, Petratos S, Turner BJ. Design and application of a peptide nucleic acid sequence targeting the p75 neurotrophin receptor. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003 Jul 21;13(14):2377-80.

60. Tetzlaff W, Graeber MB, Bisby MA, Kreutzberg GW. Increased glial fibrillary acidic protein synthesis in astrocytes during retrograde reaction of the rat facial nucleus. *Glia*. 1988;1(1):90-5.
61. Kong J, Xu Z. Overexpression of neurofilament subunit NF-L and NF-H extends survival of a mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*. 2000;281:72-4.
62. Alves CJ. *Caracterização do papel da célula de schwann no processo de neurodegeneração do neurônio motor na esclerose lateral amiotrófica no modelo animal transgênico e no nervo periférico de pacientes: estudo in vitro* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2015.
63. Brem RB, Kruglyak L. The landscape of genetic complexity across 5,700 gene expression traits in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 1; 102:1572–7.
64. Kogenaru S, Yan Q, Guo Y, Wang N. RNA-seq and *microarray* complement each other in transcriptome profiling. *BMC Genomics*. 2012; 13:629. Published online 2012 Nov 15.
65. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. 2009 Jan; 10(1):57-63.
66. Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*. 2008;455(7209):64–71.
67. Barabási A-L, Gulbahce N, Loscalzo J. Network medicine: a network-based approach to human disease. *Nat Rev. Genet*. 2011;12(1):56–68.
68. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis-real time monitoring of DNA amplification. *Bio/Technology*. 1993;11(9):1026-30.
69. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP: Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques*. 1997;22:130-8.
70. Kotni MK, Zhao M, Wei DQ. Gene expression profiles and protein-protein interaction networks in amyotrophic lateral sclerosis patients with C9orf72 mutation. *Orphanet J Rare Dis*. 2016;11:48.
71. Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology (GO) project in 2006. *Nucleic Acids Res*. 2006 Jan 1;34:D322–D326.
72. Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M, Tanabe M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res*. 2012 Jan;40 (Database issue):D109-14.
73. Prifti E, Zucker JD, Clément K, Henegar C. Interactional and functional centrality in transcriptional co-expression networks. *Bioinformatics*. 2010 Dec 15;26(24):3083-9.

74. Zhang B, Horvath S. A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2005;4:Article17.
75. Chadi G, Silva C, Maximino JR, Fuxe K, da Silva GO. Adrenalectomy counteracts the local modulation of astroglial fibroblast growth factor system without interfering with the pattern of 6-OHDA-induced dopamine degeneration in regions of the ventral midbrain. *Brain Res*. 2008;1190:23-38.
76. Dallo JG, Valadão JBR Jr, Silva C, Luca BA, Levy BFA. Differential astroglial responses in the spinal cord of rats submitted to a sciatic nerve double crush treated with local injection of cultured Schwann cell suspension or lesioned spinal cord extract: implications on cell therapy for nerve repair. *Acta Cir Bras*. 2007;22(6):485-94.
77. Duobles T, Lima Tde S, Levy Bde F, Chadi G. S100beta and fibroblast growth factor-2 are present in cultured Schwann cells and may exert paracrine actions on the peripheral nerve injury. *Acta Cir Bras*. 2008;23(6):555-60.
78. Leme RJ, Chadi G. Distant microglial and astroglial activation secondary to experimental spinal cord lesion. *Arq Neuropsiquiatr*. 2001;59(3):483-92.
79. Scorisa JM, Duobles T, Oliveira GP, Maximino JR, Chadi G. The review of the methods to obtain non-neuronal cells to study glial influence on Amyotrophic Lateral Sclerosis pathophysiology at molecular level in vitro. *Acta Cir Bras*. 2010;25(3):281-9.
80. The Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale. Assessment of activities of daily living in patients with amyotrophic lateral sclerosis. The ALS CNTF treatment study (ACTS) phase I-II Study Group. *Arch Neurol*. 1996 Feb;53(2):141-7.
81. Medical Research Council. *Medical Research Council Scale*. Aids to examination of the peripheral nervous system. Memorandum no. 1976;45.
82. Extensor Hallucis Brevis. Available from: [http://pixshark.com/extensor -hallucis-brevis.htm](http://pixshark.com/extensor-hallucis-brevis.htm).
83. Novoradovskaya N, Whitfield ML, Basehore LS, Novoradovsky A, Pesich R, Usary J, Karaca M, Wong WK, Aprelikova O, Fero M, Perou CM, Botstein D, Braman J. Universal Reference RNA as a standard for *microarray* experiments. *BMC Genomics*. 2004;9(5):20.
84. Huang da W, Sherman BT, Stephens R, Baseler MW, Lane HC, Lempicki RA. DAVID gene ID conversion tool. *Bioinformation*. 2008;2(1):428-30.
85. Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, Franz M, Grouios C, Kazi F, Lopes CT, Maitland A, Mostafavi S, Montojo J, Shao Q, Wright G, Bader GD, Morris Q. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res*. 2010; 38:W214-20.

86. Scardoni G, Petterlini M, Laudanna C. Analyzing biological network parameters with CentiScaPe. *Bioinformatics*. 2009; 25(21):2857-9.
87. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR green I monitoring during amplification. *Biotechniques*. 1998;24(6):954-8, 960, 962.
88. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25:402-8.
89. Armon C. Epidemiology of ALS/MND. Shaw P and strong M, eds. Motor Neuron Disorders. *Elsevier Sciences*. 2003;167-206.
90. Manjaly ZR, Scott KM, Abhinav K, Wijesekera L, Ganesalingam J, Goldstein LH, Janssen A, Dougherty A, Willey E, Stanton BR, Turner MR, Ampong MA, Sakel M, Orrell RW, Howard R, Shaw CE, Leigh PN, Al-Chalabi A. The sex ratio in amyotrophic lateral sclerosis: a population based study. *Amyotroph Lateral Scler*. 2010 Oct;11(5):439-42.
91. Govoni V, Della Coletta E, Cesnik E, Casetta I, Granieri E. Can the age at onset give a clue to the pathogenesis of ALS? *Acta Neurol Belg*. 2017 Mar;117(1):221-7.
92. Brockington A, Heath PR, Holden H, Kasher P, Bender FL, Claes F, Lambrechts D, Sendtner M, Carmeliet P, Shaw PJ. Downregulation of genes with a function in axon outgrowth and synapse formation in motor neurones of the VEGFdelta/delta mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Genomics*. 2010 Mar 26;11:203.
93. Dallas PB, Gottardo NG, Firth MJ, Beesley AH, Hoffmann K, Terry PA, Freitas JR, Boag JM, Cummings AJ, Kees UR. Gene expression levels assessed by oligonucleotide *microarray* analysis and quantitative real-time RT-PCR – how well do they correlate? *BMC Genomics*. 2005 Apr 27;6:59.
94. Rajeevan MS, Vernon SD, Taysavang N, Unger ER. Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. *J Mol Diagn*. 2001 Feb;3(1):26-31.
95. Ferraiuolo L, Higginbottom A, Heath PR, Barber S, Greenald D, Kirby J, Shaw PJ. Dysregulation of astrocyte-motoneuron cross-talk in 130eparin superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 2011 Sep;134(Pt 9):2627-41.
96. Yoshihara T, Ishigaki S, Yamamoto M, Liang Y, Niwa J, Takeuchi H, Doyu M, Sobue G. Differential 130 eparin 130 al 130 of inflammation- and apoptosis-related genes in spinal cords of a eparin SOD1 transgenic mouse eparin familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*. 2002 Jan;80(1):158-67.

97. Brockington A, Heath PR, Holden H, Kasher P, Bender FL, Claes F, Lambrechts D, Sendtner M, Carmeliet P, Shaw PJ. Downregulation of genes with a function in axon outgrowth and synapse formation in motor neurones of the VEGFdelta/delta mouse eparin amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Genomics*. 2010 Mar 26;11:203.
98. Dangond F, Hwang D, Camelo S, Pasinelli P, Frosch MP, Stephanopoulos G, Stephanopoulos G, Brown RH Jr, Gullans SR. Molecular signature of late-stage human ALS revealed by eparinal profiling of eparinal spinal cord gray matter. *Physiol Genomics*. 2004 Jan 15;16(2):229-39.
99. D'Arrigo A, Colavito D, Peña-Altamira E, Fabris M, Dam M, Contestabile A, Leon A. Transcriptional profiling in the lumbar spinal cord of a mouse eparin amyotrophic lateral sclerosis: a role for wild-type superoxide dismutase 1 in sporadic disease? *J Mol Neurosci*. 2010 Jul;41(3):404-15.
100. Ferraiuolo L, Heath PR, Holden H, Kasher P, Kirby J, Shaw PJ. Microarray analysis of the cellular pathways involved in the adaptation to and progression of motor neuron injury in the SOD1 G93A mouse eparin familial ALS. *J Neurosci*. 2007 Aug 22;27(34):9201-19.
101. Guipponi M, Li QX, Hyde L, Beissbarth T, Smyth GK, Masters CL, Scott HS. SAGE analysis of genes differentially expressed in presymptomatic TgSOD1G93A transgenic mice identified cellular processes involved in early stage of ALS pathology. *J Mol Neurosci*. 2010 May;41(1):172-82.
102. Jiang YM, Yamamoto M, Kobayashi Y, Yoshihara T, Liang Y, Terao S, Takeuchi H, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Tanaka F, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G. Gene eparinal profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2005 Feb;57(2):236-51.
103. Lobsiger CS, Boillée S, Cleveland DW. Toxicity from eparina SOD1 mutants dysregulates the eparinal system and the neuronal regenerative response in ALS motor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 1;104(18):7319-26.
104. Malaspina A, de Belleruche J. Spinal cord molecular profiling provides a better understanding of amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis. *Brain Res Brain Res Rev*. 2004 Jul;45(3):213-29. Review.
105. Offen D, Barhum Y, Melamed E, Embacher N, Schindler C, Ransmayr G. Spinal cord mRNA profile in patients with ALS: comparison with transgenic mice expressing the human SOD-1 mutant. *J Mol Neurosci*. 2009 Jun;38(2):85-93.
106. Olsen MK, Roberds SL, Ellerbrock BR, Fleck TJ, McKinley DK, Gurney ME. Disease mechanisms revealed by transcription profiling in SOD1-G93A transgenic mouse spinal cord. *Ann Neurol*. 2001 Dec;50(6):730-40.

107. Perrin FE, Boisset G, Docquier M, Schaad O, Descombes P, Kato AC. No widespread induction of cell death genes occurs in ependymal motoneurons in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Hum Mol Genet*. 2005 Nov 1;14(21):3309-20.
108. Saris CG, Groen EJ, van Vught PW, van Es MA, Blauw HM, Veldink JH, van den Berg LH. Gene expression profile of SOD1-G93A mouse spinal cord, blood and muscle. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2013 Apr;14(3):190-8.
109. Yamamoto M, Tanaka F, Sobue G. Gene expression profile of spinal ventral horn in ALS. *Brain Nerve*. 2007 Oct;59(10):1129-39. Review. Japanese.
110. Boncinelli E. Homeobox genes and disease. *Curr Opin Genet Dev*. 1997 Jun;7(3):331-7.
111. Lee JY, Park KS, Cho EJ, Joo HK, Lee SK, Lee SD, Park JB, Chang SJ, Jeon BH. Human HOXA5 homeodomain enhances protein transduction and its application to vascular inflammation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Jul 1;410(2):312-6.
112. Kas K, Michiels L, Merregaert J. Genomic structure and expression of the human fau gene: encoding the expression protein S30 fused to a expression-like protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992 Sep 16;187(2):927-33.
113. Perina D, Korolija M, Hadžija MP, Grbeša I, Belužić R, Imešek M, Morrow C, Marjanović MP, Bakran-Petricoli T, Mikoč A, Četković H. Functional and Structural Characterization of FAU Gene/Protein from Marine Sponge Suberites domuncula. *Mar Drugs*. 2015 Jul 7;13(7):4179-96.
114. Schweitzer A, Aufderheide A, Rudack T, Beck F, Pfeifer G, Plitzko JM, Sakata E, Schulten K, Förster F, Baumeister W. Structure of the human 26S proteasome at a resolution of 3.9 Å. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Jul 12;113(28):7816-21.
115. UBA52 ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1 [*Homo sapiens* (human)] PubMed. Gene ID: 7311, updated on 19-Jul-2016 .
116. El Kasmi KC, Smith AM, Williams L, Neale G, Panopolous A, Watowich SS, Hacker H, Foxwell BMJ, Murray PJ. Cutting edge: a transcriptional repressor and corepressor induced by the STAT3-regulated anti-inflammatory signaling pathway. *J. Immun*. 2007. 179: 7215-7219.
117. Liu L, McKeehan WL. Sequence analysis of LRPPRC and its SEC1 domain interaction partners suggests roles in cytoskeletal organization, vesicular trafficking, nucleocytoplasmic shuttling, and chromosome activity. *Genomics*. 2002 Jan;79(1):124-36.
118. Enunlu I, Ozansoy M, Basak AN. Alfa-class prefoldin protein UXT is a novel interacting partner of amyotrophic lateral sclerosis 2 (Als2) protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Sep 30;413(3):471-5.

119. Sasarman F, Brunel-Guitton C, Antonicka H, Wai T, Shoubridge EA. LRPPRC and SLIRP interact in a ribonucleoprotein complex that regulates posttranscriptional gene expression in mitochondria. *LSFC Consortium.Mol Biol Cell*. 2010 Apr 15;21(8):1315-23.
120. Matsuura S, Igarashi M, Tanizawa Y, Yamada M, Kishi F, Kajii T, Fujii H, Miwa S, Sakurai M, Nakazawa A. Human adenylate kinase deficiency associated with hemolytic anemia: a single base substitution affecting solubility and catalytic activity of the cytosolic adenylate kinase. *J. Biol. Chem*. 1989;264:10148-55.
121. Noma T. Dynamics of nucleotide 133 eparin 133 a 1133 as a supporter of life phenomena. *J Med Invest*. 2005 Aug;52(3-4):127-36. Review.
122. Dzeja P, Terzic A. Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing. *Int J Mol Sci*. 2009 Apr 17;10(4):1729-72.
123. Park H, Kam TI, Kim Y, Choi H, Gwon Y, Kim C, Koh JY, Jung YK. Neuropathogenic role of adenylate kinase-1 in A β -mediated tau phosphorylation via AMPK and GSK3 β . *Hum Mol Genet*. 2012 Jun 15;21(12):2725-37.
124. Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2007 Sep;8(9):663-72. Review.
125. Lucas JJ, Hernández F, Gómez-Ramos P, Morán MA, Hen R, Avila J. Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3 β conditional transgenic mice. *EMBO J*. 2001 Jan 15;20(1-2):27-39.
126. Dai M.-S, Shi D, Jin Y, Sun X.-X, Zhang Y, Grossman SR, Lu H. Regulation of the MDM2-p53 pathway by ribosomal protein L11 involves a post-ubiquitination mechanism. *J. Biol. Chem*. 2006; 281: 24304-13.
127. Chen Y, Ni H, Zhao Y, Chen K, Li M, Li C, Zhu X, Fu Q. Potential Role of lncRNAs in Contributing to Pathogenesis of Intervertebral Disc Degeneration Based on Microarray Data. *Med Sci Monit*. 2015 Nov 10;21:3449-58.
128. Kalita K, Makonchuk D, Gomes C, Zheng JJ, Hetman M. Inhibition of nucleolar transcription as a trigger for neuronal apoptosis. *J Neurochem*. 2008 Jun 1;105(6):2286-99.
129. Pietrzak M, Rempala G, Nelson PT, Zheng JJ, Hetman M. Epigenetic silencing of nucleolar rRNA genes in Alzheimer's disease. *PloS One*. 2011;6(7):e22585.
130. Tsoi H, Lau TC, Tsang SY, Lau KF, Chan HY. CAG expansion induces nucleolar stress in polyglutamine diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Aug 14;109(33):13428-33.

131. Daftuar L, Zhu Y, Jacq X, Prives C. Ribosomal proteins RPL37, RPS15 and RPS20 regulate the Mdm2-p53-MdmX network. *PloS One*. 2013 Jul 16;8(7):e68667.
132. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Available from: <http://www.genome.jp/kegg>.
133. Kalathur RK, Hernández-Prieto MA, Futschik ME. Huntington's disease and its therapeutic target genes: a global functional profile based on the HD Research Crossroads database. *BMC Neurol*. 2012 Jun 28;12:47.
134. Mougeot JL, Li Z, Price AE, Wright FA, Brooks BR. Microarray analysis of peripheral blood lymphocytes from ALS patients and the SAFE detection of the KEGG ALS pathway. *BMC Med Genomics*. 2011 Oct 25;4:74.
135. Korostelev AA. Structural aspects of translation termination on the ribosome. *RNA*. 2011 Aug;17(8):1409-21.
136. Wool IG. Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem Sci*. 1996 May;21(5):164-5.
137. Warner JR, McIntosh KB. How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? *Mol Cell*. 2009 Apr 10;34(1):3-11.
138. Mitrovich QM, Anderson P. Unproductively spliced ribosomal protein mRNAs are natural targets of mRNA surveillance in *C. elegans*. *Genes Dev*. 2000 Sep 1;14(17):2173-84.
139. Riveros C, Mellor D, Gandhi KS, McKay FC, Cox MB, Berretta R, Vaezpour SY, Inostroza-Ponta M, Broadley SA, Heard RN, Vucic S, Stewart GJ, Williams DW, Scott RJ, Lechner-Scott J, Booth DR, Moscato P. A transcription factor map as revealed by a genome-wide gene expression analysis of whole-blood mRNA transcriptome in multiple sclerosis. *ANZgene Multiple Sclerosis Genetics Consortium*. *PloS One*. 2010 Dec 1;5(12):e14176.
140. Nagaraj S, Senthil-Kumar M, Ramu VS, Wang K, Mysore KS. Plant ribosomal proteins, RPL12 and RPL19, Play a role in nonhost disease resistance against bacterial pathogens. *Front Plant Sci*. 2016 Jan 6;6:1192.
141. Prusiner SB, Scott MR, DeArmond SJ, Cohen FE. Prion protein biology. *Cell*. 1998 May 1. 93(3):337-48.
142. Braak H, Thal DR, Ghebremedhin E, Del Tredici K. Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2011 Nov. 70(11):960-9.
143. Stuart JM, Segal E, Koller D, Kim SK. A gene-coexpression network for global discovery of conserved genetic modules. *Science*. 2003;302(5643):249-55.
144. Weirauch MT. *Gene coexpression networks for the analysis of DNA microarray data. applied statistics for network biology: methods in systems biology*. 2011.

145. Ta TV, Baraniak D, Julian J, Korostoff J, Carson DD, Farach-Carson MC. Heparan sulfate interacting protein (HIP/L29) negatively regulates growth responses to basic fibroblast growth factor in gingival fibroblasts. *J Dent Res*. 2002 Apr;81(4):247-52.
146. Liu JJ, Zhang J, Ramanan S, Julian J, Carson DD, Hooi SC. Heparin/heparan sulfate interacting protein plays a role in apoptosis induced by anticancer drugs. *Carcinogenesis*. 2004 Jun;25(6):873-9.
147. Menna E, Zambetti S, Morini R, Donzelli A, Disanza A, Calvigioni D, Braidà D, Nicolini C, Orlando M, Fossati G, Cristina Regondi M, Pattini L, Frassoni C, Francolini M, Scita G, Sala M, Fahnestock M, Matteoli M. Eps8 controls dendritic spine density and synaptic plasticity through its actin-capping activity. *EMBO J*. 2013 Jun 12;32(12):1730-44.