Thaís Virgínia Moura Machado Costa

**Análise da presença de mutação no gene *TARDBP* em pacientes com
degeneração lobar frontotemporal e implementação de metodologia para
determinação dos polimorfismos do gene *APOE* em pacientes com doença de
Alzheimer em São Paulo – SP**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa: Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Gerson Chadi

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Costa, Thaís Virgínia Moura Machado

Análise da presença de mutação no gene *TARDBP* em pacientes com degeneração lobar frontotemporal e implementação de metodologia para determinação dos polimorfismos do gene *APOE* em pacientes com doença de Alzheimer em São Paulo - SP / Thaís Virgínia Moura Machado Costa. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Neurologia.

Orientador: Gerson Chadi.

Descritores: 1.Degeneração lobar frontotemporal 2.Mutação 3.*TARDBP*
4.Proteinopatias TDP-43 5.Doença de Alzheimer 6.*APOE* 7.Polimorfismo genético
8.Metanálise

USP/FM/DBD-233/12

Dedico este trabalho à minha mãe, meu maior exemplo de caráter, dedicação e amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, saúde e força para seguir em frente.

À minha mãe (Virgínia), pelo amor, dedicação, ensinamentos e pelo exemplo de mãe e de pessoa que é. E por estar ali, acreditando em mim e sempre dizendo para eu não desistir.

À minha vó Nelzimar Moura, minha segunda mãe, pelo seu exemplo de coragem e pela ajuda sempre. Ao meu avô e à todos os meus familiares que mesmo longe se faziam presentes me dando força.

À Kalena Barros, pela paciência, carinho e companheirismo. Por dividir comigo os melhores momentos e aqueles mais difíceis. E por fazer parte da minha vida há tanto tempo e por fazê-la melhor.

À doutoranda Gabriela Pintar, pela enorme ajuda na realização de todo este trabalho, tanto na etapa laboratorial, quanto na confecção da dissertação. Agradeço pelas correções e principalmente pela paciência! E à Gabi (amiga), pela incomensurável disposição e boa vontade em me ajudar sempre em tudo. Um anjo na minha vida. Obrigada mesmo!

À amiga Florence Dinucci, pela amizade, pelos conselhos e por tantos ótimos momentos. Pessoa única.

Às amigas do laboratório, Tatiana Duobles, Juliana Scorisa e Chary Ely, pela ajuda diária, pelo incentivo e por fazerem essa difícil jornada mais alegre e recheada de bons momentos.

Ao meu primo e amigo, Márcio Arthur, pelas inúmeras ajudas na ortografia e pelo incentivo.

Ao amigo Leonel Takada, pela ajuda profissional, no esclarecimento das dúvidas da parte clínica do trabalho; e pela amizade que mesmo tão longe se fez presentes com muitos conselhos e incentivos.

À Dr^a. Valéria Bahia, pela sua grande ajuda especialmente na reta final.

À bióloga molecular Elisângela Quedas, pela realização do sequenciamento e pela grande ajuda durante os dois últimos anos. E também à Dr^a. Suemi Marui, responsável pelo LIM-25 (Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular), onde o sequenciamento foi realizado.

Ao Dr. Chin Jia Lin, pela imensa e fundamental ajuda na parte estatística e pela paciência de sempre.

Ao Prof. Dr. Gerson Chadi, pela oportunidade em realizar este trabalho.

Ao Dr. Ricardo Nitrini, por ter acreditado em mim no início de tudo.

Ao Dr. Edmar Zanoteli, pela ajuda nas diretrizes no início do trabalho e pelas dicas durante toda a execução do mesmo.

À pesquisadora Jéssica Maximino, por sua disposição em ajudar sempre.

Aos funcionários do LIM-45, Sarah e Gilmar, por serem sempre tão solícitos.

À FAPESP (2010/20457-7), ao CNPq e à CAPES.

"Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e viver com ousadia. Pois o triunfo pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante."

Charles Chaplin

Esta dissertação 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 FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos Gerais	1
1.2 Degeneração Lobar Frontotemporal	4
1.3 Doença de Alzheimer	7
2. OBJETIVOS	11
2.1 Geral	11
2.2 Específicos.....	11
3. MÉTODOS	12
3.1 Aspectos éticos	12
3.2 Casuística.....	12
3.3 Extração de DNA	13
3.4 Sequenciamento do gene <i>TARDBP</i>	13
3.5 Genotipagem do gene <i>APOE</i>	15
3.6 Metanálise	16
3.7 Análise Estatística	17
4. RESULTADOS.....	18
4.1 Sequenciamento do <i>TARDBP</i>	18
4.2 Genotipagem do <i>APOE</i>	19
5. DISCUSSÃO	23
5.1 Sequenciamento do <i>TARDBP</i>	23
5.2 Genotipagem do <i>APOE</i>	24
6. CONCLUSÃO	27
7. REFERÊNCIAS.....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Localização da mutação encontrada (I383V) no gene <i>TARDBP</i>	18
Figura 2 -	Cromatogramas.....	19
Figura 3 -	Metanálise dos alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ em pacientes com DA (<i>Forest plot</i>).....	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características da amostra.....	12
Tabela 2 -	Pares de oligonucleotídeos usados para amplificar a região codificadora do gene <i>TARDBP</i>	14
Tabela 3 -	Sequências de oligonucleotídeos usados para qPCRs da região polimórfica do éxon 4 do gene <i>APOE</i> desenhados a partir de sequência humana do mesmo gene.....	15
Tabela 4 -	Combinação de <i>primers</i> de acordo com cada reação correspondente para cada alelo do gene <i>APOE</i>	15
Tabela 5 -	Descrição dos dados populacionais dos estudos incluídos na metanálise.....	16
Tabela 6 -	Distribuição das frequências genotípicas do <i>APOE</i> em 30 indivíduos com DA provável.....	20
Tabela 7 -	Distribuição das frequências alélicas do <i>APOE</i> em 30 indivíduos com DA provável.....	20
Tabela 8 -	Distribuição das frequências alélicas e do <i>APOE</i> em <i>pool</i> de pacientes com DA e em <i>pool</i> de indivíduos controles de estudos brasileiros, e ainda em pacientes com DA do presente estudo.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS

DLFT	Degeneração Lobar Frontotemporal
DFT	Demência Frontotemporal
vcDFT	Variante Comportamental da DFT
DS	Demência Semântica
APNF	Afasia Progressiva Não Fluente
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
DA	Doença de Alzheimer
DLFT-U	DLFT com inclusões de ubiquitina
SNC	Sistema Nervoso Central
TDP-43	Do inglês, Transactive response (TAR) DNA binding protein
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DLFT-TDP	TDP-43 como proteína principal na DLFT-U
DFT-ELA	Comorbidade entre DFT e ELA
RNA	Ácido Ribonucleico
C-terminal	Carboxi terminal
A β	Beta Amiloide
ENF	Emaranhados Neurofibrilares
APP	Do inglês, Amyloid Precursor Protein
ApoE	Apolipoproteína E
EDTA	Do inglês, Ethylene Diamine TetrAcetic Acid
RPM	Rotações Por Minuto
Tris	Do inglês, Trishydroxymethylaminomethane
Tris-HCl	Do inglês, Tris-Hydrochloride
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TE	Tris-EDTA
PCR	Do inglês, Polimerase Chain Reaction
pH	Potencial Hidrogeniônico
pb	Pares de base
qPCR	Do inglês, Quantitative PCR
NCBI	Do ingles, National Center for Biotechnology Information
Ct	Do inglês, Cycle threshold
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
MMSE	Do inglês, Mini-Mental State Examination
CDR	Do inglês, Clinical Dementia Rating Scale
OR	Do inglês, Odds ratio
dbSNP	Do inglês, Single Nucleotide Polymorphism database
IC	Intervalo de Confiança
UTR	Do inglês, Untranslated Region
PCR-RFLP	Do inglês, PCR - Restriction Fragment Length Polymorfism

LISTA DE SÍMBOLOS

kDa	Quilodalton
ϵ_4	Épsilon 4
ϵ_3	Épsilon 3
ϵ_2	Épsilon 2
$\pm$	Desvio padrão
mL	Mililitro
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
HCO ₃	Ácido carbônico
M	Molar
NaCl	Cloreto de sódio
μ L	Microlitro
°C	Graus Celcius
ng	Nanograma
mM	Milimolar
KCl	Cloreto de potássio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
μ M	Micromolar
H ₂ O	Água
nM	Nanomolar
χ^2	Qui-quadrado

RESUMO

Costa TVMM. *Análise da presença de mutação no gene TARDBP em pacientes com degeneração lobar frontotemporal e implementação de metodologia para determinação dos polimorfismos do gene APOE em pacientes com doença de Alzheimer em São Paulo – SP* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Atualmente, as demências tornam-se mais prevalentes e constituem-se como um importante problema de saúde pública mundial. A Degeneração Lobar Frontotemporal (DLFT) e a Doença de Alzheimer (DA) são as de maior incidência. A investigação dos fatores de risco para as demências degenerativas inscreve-se entre os temas mais relevantes das neurociências e a avaliação dos fatores de risco de natureza genética tem produzido contribuições importantes. Na DLFT, mutações no gene *TARDBP*, codificador da proteína nuclear TDP-43, estão entre as ocorrências genéticas mais descritas, enquanto que para a DA, o alelo $\epsilon 4$ do gene da apolipoproteína E (*APOE*) é o principal fator de risco. Pacientes com diagnóstico clínico de DLFT ($n=47$) e de DA provável ($n=30$) recebidos do ambulatório do Grupo de Neurologia Cognitiva e do Comportamento (GNCC) da Clínica Neurológica do HC-FMUSP foram convidados a participar do estudo. Amostras de sangue foram coletadas para a realização da extração de DNA linfocitário. Os éxons de 1-6 do gene *TARDBP* foram amplificados por PCR e seus produtos foram sequenciados em sequenciador automático. Os polimorfismos do gene *APOE* foram determinados através da técnica de PCR em tempo real. A análise do gene da TDP-43 em pacientes com DLFT mostrou a presença de uma mutação na região do éxon 6 do *TARDBP* (g.14935A>G) em um paciente do sexo masculino, com idade de 54 anos e diagnóstico de demência semântica. Na genotipagem dos pacientes de DA, foi observado que a metodologia utilizada, através de PCR em tempo real mostrou-se eficiente em detectar os polimorfismos do gene *APOE*, fornecendo resultados compatíveis quando comparados aos demais estudos brasileiros publicados anteriormente.

Descritores: Degeneração lobar frontotemporal; Mutação; *TARDBP*; Proteinopatias TDP-43; Doença de Alzheimer; *APOE*; Polimorfismo genético; Metanálise.

ABSTRACT

Costa TVMM. *Analysis of the presence of mutation in TARDBP gene in patients with frontotemporal lobar degeneration and implementation of APOE gene methodology for polymorphism determination in patients with Alzheimer's disease in São Paulo – SP* [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2012.

Brazil is one of the developing countries that are undergoing a process of demographic transition in which the elderly represents a significant proportion of the total population. Neurodegenerative illnesses most commonly appear at such ages. Frontotemporal lobar degeneration (FTLD) and Alzheimer's disease (AD) are the most frequent causes for dementia. The investigation of risk factors for degenerative dementia is a relevant subject of neurosciences and the evaluation of the nature of genetic risk factors has produced the most important contributions. Mutations in *TARDBP* gene, the encoder of the TDP-43 nuclear protein, appear as the most frequent genetic occurrences for FTLD, whereas, in DA, the $\epsilon 4$ allele of the apolipoprotein E (*APOE*) is the major genetic risk factor. Patients with clinical diagnosis of FTLD types of families and sporadic ($n=47$) and probable AD ($n=30$) from the ambulatory of Cognitive Neurology Group and Behavior (CNGB) of Neurological Clinic of HC-FMUSP were invited to participate in this study. Blood samples were collected for lymphocytic DNA extraction. The *APOE* gene polymorphisms are being determined through the real time PCR technique. The 1-6 exons of *TARDBP* gene were amplified by PCR and their products were sequenced in automated sequencer. The TDP-43 gene analysis in patients with FTLD showed the presence of one mutation in the region of exon 6 *TARDBP* gene in a male patient of 54 years old, with diagnoses of semantic dementia. Regarding DA patients genotyping, the real time methodology has been shown as an efficient approach to detect *APOE* polymorphisms, presenting data similar to those observed in other Brazilian studies.

Descriptors: Frontotemporal lobar degeneration; Mutation; *TARDBP*; TDP-43 proteinopathies; Alzheimer's disease; *APOE*; Genetic polymorphism; Meta-analysis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

O envelhecimento populacional é um fenômeno global, uma vez que a população idosa aumenta em todo o mundo, e em especial nos países em desenvolvimento. O Brasil é um dos países em emergentes nos quais o envelhecimento da população está ocorrendo com maior velocidade. Neste sentido, as demências tornam-se mais prevalentes e constituem um importante problema de saúde pública no Brasil e em outros países em desenvolvimento (Lopes e Bottino, 2002; Scazufca et al., 2002; Scazufca et al., 2008). Segundo dados recentes da Organização Mundial de Saúde, estima-se que pelo menos 35,6 milhões de pessoas têm demência, com cerca de 7,7 milhões de novos casos por ano, o que corresponde a um caso a cada quatro segundos. Ainda, o número de pessoas afetadas com demência deve dobrar a cada 20 anos. Em 2030, serão cerca 65,7 milhões e em 2050, 115,4 milhões de indivíduos terão demência. Além disso, a prevalência de demência dobra a cada cinco anos de aumento da faixa etária, indo de 3% aos 70 anos para 20 a 30% aos 85 anos (Lopes e Bottino, 2002; Scazufca et al., 2002; Ferri et al., 2005; Bottino et al., 2008; World Health Organization, 2012).

Demência é um fenótipo complexo causado por processos neuropatológicos que resultam em um declínio substancial da função cognitiva, grave o suficiente para interferir nas atividades sociais e/ou ocupacionais do indivíduo (Rademakers e Rovelet-Lecrux, 2009; Novelli et al., 2010; Lopez, 2011; Schlesinger et al., 2011).

Na idade pré-senil, a segunda causa de demência mais comum é a Degeneração Lobar Frontotemporal (DLFT), representando 50% dos casos de demência em indivíduos pré-senis (até 65 anos de idade) e 5 a 10% de todos os pacientes com demência (McKeith, 2004; Graff-Radford e Woodruff, 2007; Arvanitakis, 2010). A DLFT é uma síndrome clinicamente e patologicamente heterogênea caracterizada por alteração significativa da personalidade, do comportamento e da linguagem, com preservação relativa da memória (Neary et al., 1998; Caixeta e Nitrini, 2001; Teixeira-Jr e Salgado, 2006; Arvanitakis, 2010; Rabinovici e Miller, 2010).

Atualmente, usa-se o termo "Demência Frontotemporal" (DFT) quando se refere à entidade clínica e o termo "Degeneração Lobar Frontotemporal" é utilizado para designar o diagnóstico anatômico. Declínio progressivo da linguagem é observado na DLFT, podendo ocorrer dificuldades na compreensão e na expressão verbal, com redução da fluência ou mesmo mutismo (Teixeira-Jr e Salgado, 2006). Contudo, as funções visuo-espaciais são preservadas. As alterações de comportamento e de linguagem observadas nos pacientes de DLFT estão associadas ao processo degenerativo observado, no qual ocorre atrofia dos lobos frontais e/ou temporais anteriores com perda neuronal importante nestas regiões (Caixeta e Nitrini, 2001; Arvanitakis, 2010; Rabinovici e Miller, 2010; Rohrer et al., 2011).

Em consenso, a DLFT foi dividida em três variantes clínicas distintas, a variante comportamental (vcDFT), a demência semântica (DS) e a afasia progressiva não fluente (APNF). A vcDFT caracteriza-se por mudanças no comportamento e na personalidade associadas com a degeneração marcante no lobo frontal direito. Os pacientes com essa variante apresentam desinibição e/ou apatia. Eles passam a ter comportamentos socialmente inadequados e/ou impulsivos e estereotipados. Além disso, podem apresentar comportamento obsessivo, hiperoralidade e hiperfagia, com preferência por alimentos doces. Há também prejuízo progressivo da autoconsciência (Neary et al., 1998; Caixeta e Nitrini, 2001; Teixeira-Jr e Salgado, 2006; Graff-Radford e Woodruff, 2007; Mackenzie et al., 2009; Rabinovici e Miller, 2010).

A DS é caracterizada por perda progressiva do conhecimento "semântico" que está associada com perda neuronal importante na região dos lobos temporais anteriores. Nesta variante, afasia fluente é observada, caracterizada por declínio na capacidade de nomeação e compreensão de palavras, objetos e conceitos, além de alterações no comportamento social. Também há a incapacidade no reconhecimento do significado de percepções visuais, conhecida por agnosia associativa. Tal perda de reconhecimento ocorre tanto para conceitos verbais quanto para não verbais, contrastando com a preservação das habilidades visuo-espaciais e da memória. O discurso torna-se cada vez mais pobre, sendo que funções como sintaxe, fonologia e funções executivas encontram-se preservadas nesses pacientes (Neary et al., 1998; Rabinovici e Miller, 2010; Yener e Papatriantafyllou, 2010).

A APNF tem como característica principal a dificuldade na produção da fala que se associa à atrofia no lobo frontal esquerdo. Os pacientes com APNF apresentam dificuldade progressiva na expressão da linguagem, esta observada pela fala lentificada e pelo esforço na sua produção. Além do déficit motor na fala, os pacientes apresentam agramatismo e parafasias fonêmicas, como aquelas relacionadas ao sequenciamento indevido de sílabas. Nestes casos, ainda há o uso incorreto dos fonemas e das preposições e os pacientes mostram-se conscientes de suas limitações de articulação. Dificuldades na leitura e na escrita também podem ocorrer, entretanto, a compreensão do significado das palavras está relativamente bem preservada e o distúrbio de linguagem ocorre na ausência de declínio cognitivo em outro domínio, embora mudanças comportamentais possam surgir no curso final da doença (Neary et al., 1998; Rabinovici e Miller, 2010; Yener e Papatriantafyllou, 2010).

É importante ressaltar que a DLFT pode ocorrer isolada ou em comorbidade com a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), a doença do neurônio motor mais comum na idade adulta, consistindo-se em uma doença neurodegenerativa progressiva caracterizada por paralisia muscular refletindo a perda progressiva de neurônios motores (Graff-Radford e Woodruff, 2007; Liscic et al., 2008; Lillo e Hodges, 2009; Wijsekera e Leigh, 2009).

Com relação à idade senil, a Doença de Alzheimer (DA) é a causa mais frequente de demência, sendo responsável por 50 a 70% de todos os casos e afetando 40% dos indivíduos com mais de 85 anos. É uma doença neurodegenerativa progressiva que compromete principalmente o hipocampo e o córtex cerebral levando a um declínio cognitivo, particularmente no domínio de memória e de funções executivas, conduzindo o indivíduo à dependência completa e morte (Almeida, 1997; Herrera et al., 2002; Nitrini et al., 2004; Forlenza, 2005; Fita et al., 2011; Hampel et al., 2011; Kato-Narita et al., 2011; Lopez, 2011; Reitz, 2011).

Nos estágios iniciais da DA, o paciente demonstra dificuldade em pensar com clareza, tende a se confundir facilmente e apresenta queda em seu rendimento funcional em tarefas complexas. Há tendência ao esquecimento de fatos recentes e dificuldade para registrar novas informações. Observa-se que o paciente passa a ter maior dificuldade para desempenhar tarefas da vida diária e de cuidados pessoais. Na

fase mais avançada da doença, nota-se a perda significativa da linguagem e da capacidade de nomear pessoas e objetos. Por fim, o indivíduo torna-se dependente de um cuidador. Outras alterações psíquicas e comportamentais, tais como psicose, alterações do humor e do sono, agitação psicomotora e agressividade, estão presentes em até 75% dos casos em algum estágio da evolução da doença. Em cada uma destas etapas, pode-se observar perda gradativa da autonomia e consequente aumento da necessidade de cuidado e supervisão constantes (Abreu et al., 2005; Forlenza, 2005).

1.2 Degeneração Lobar Frontotemporal

Na DLFT, as ocorrências neuropatológicas mais comuns são inclusões de proteínas ubiquitinadas (DLFT-U). A ubiquitinação de proteínas deformadas que originam agregados no citoplasma e/ou no núcleo de células do Sistema Nervoso Central (SNC) é uma característica marcante das doenças neurodegenerativas. Tais proteínas deformadas já foram identificadas em muitos distúrbios neurodegenerativos (Neumann et al., 2006).

A proteína TDP-43 foi identificada em 2006 como uma das principais proteínas ubiquitinadas em neurônios e células gliais nos casos de DLFT-U, por isso o nome DLFT-TDP (Neumann et al., 2006). Inclusões de TDP-43 também podem ser encontradas em pacientes de ELA ou quando há comorbidade entre as duas doenças. Mutações no gene da TDP-43 têm sido associadas aos casos de ELA com herança autossômica dominante. Entretanto, o papel primário da TDP-43 na patogênese da DLFT e da ELA ainda não foi estabelecido (Rabinovici e Miller, 2010; Yener e Papatriantafyllou, 2010).

As variantes clínicas da DLFT apresentam também componentes neuropatológicos distintos. A vcDFT forma agregados protéicos tanto de TDP-43 quanto de tau, a DS está mais relacionada à formação de agregados de TDP-43, a APNF apresenta, mais frequentemente, agregados de tau e, finalmente, a sobreposição clínica entre DLFT e ELA (DFT-ELA) relaciona-se a agregados de TDP-43 (Yener e Papatriantafyllou, 2010). A formação das inclusões de tau associadas à microtúbulos e de TDP-43 pode resultar de mutações nos genes *MAPT* e *TARDBP* que, respectivamente, codificam tais proteínas (Corrado et al., 2009; Rabinovici e Miller, 2010).

A DLFT é uma doença clínica, patológica e geneticamente heterogênea, com história familiar positiva em 30 a 40% dos casos, sendo que destes, cerca de 10% apresentam um padrão de herança autossômica dominante. Diversos fatores genéticos em diferentes *loci* cromossômicos contribuem para a doença (Baker et al., 2006; Neumann et al., 2006; Liscic et al., 2008; Neumann et al., 2009; Rabinovici e Miller, 2010; Yener e Papatriantafyllou, 2010; Rohrer et al., 2011).

Os casos de DLFT familiar em que há um padrão de herança autossômica dominante podem ser causados por mutações em diversos genes, dentre eles, o *MAPT* (do inglês, *microtubule-associated protein tau*), codificador da proteína tau, o gene codificador da proteína progranulina (*GRN*), o gene *CHMP2B* (do inglês, *charged multivesicular body protein 2b*) e o gene *VCP* (do inglês, *valosin-containing protein*). Até o momento, cerca de 50 mutações no gene *GRN* e aproximadamente 40 mutações no gene *MAPT* foram identificadas como causas importantes da DLFT, sendo responsáveis por 10 a 20% dos casos familiares de DLFT e por 5 a 10% de todos os casos da doença. Dentre as variantes clínicas da DLFT, a vcDFT e a DFT-ELA são as que apresentam um padrão de herança familiar mais importante, em seguida a APNF e por último a DS (Liscic et al., 2008; Neumann et al., 2009; Rabinovici e Miller, 2010; Yener e Papatriantafyllou, 2010).

Cerca de 60 a 75% dos casos de DLFT parecem ser esporádicos. Entretanto, há alta porcentagem, por volta de 30 a 40%, de história familiar positiva de problemas relacionados, incluindo demência, distúrbios psiquiátricos e abuso de substâncias, sem um padrão claro de herança, sugerindo que outros fatores, particularmente alterações genéticas, também podem influenciar o desenvolvimento da DLFT esporádica (Rabinovici e Miller, 2010; Yener e Papatriantafyllou, 2010).

No caso particular da DFT-ELA, evidências mostram que além da sobreposição clínica, há também o envolvimento do compartilhamento das mesmas bases moleculares em ambas as doenças. Tais evidências fundamentam-se principalmente na presença de uma mutação nova no gene *C9ORF72* (9p21.2), em casos familiares com vários indivíduos acometidos pela DLFT, pela ELA, ou por ambas (Neumann et al., 2009; DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011; Zago et al., 2011).

Outro fato que evidencia tal sobreposição é a presença da proteinopatia da TDP-43 no espectro das duas doenças, especificamente em uma proporção significativa casos de DLFT sem a ELA, na maioria dos pacientes de DFT-ELA e em muitos pacientes com ELA familiar e esporádica (Lillo e Hodges, 2009)

Pelo menos 30 mutações no gene *TARDBP*, este que codifica a proteína TDP-43, já foram descritas em pacientes com ELA familiar e esporádica e com DFT-ELA. Mais recentemente, cinco variações genéticas foram relatadas em pacientes com vcDFT sem ELA. Tais achados, além do fato de que essas mutações podem mostrar um padrão de herança autossômica dominante em pacientes de ELA familiar, corroboram com o papel patológico da TDP-43 e sugerem que tais mutações podem ser patogênicas (Benajiba et al., 2009; Neumann et al., 2009; Borroni et al., 2010; Zago et al., 2011).

O gene *TARDBP* localiza-se no cromossomo 1 (1p36.22) e é formado por seis éxons que codificam a proteína TDP-43, esta que possui 414 aminoácidos e apresenta o peso molecular de 43kDa. O nome da proteína TDP-43 deriva-se das iniciais do seu nome em inglês, a *transactive response (TAR) DNA binding protein* (Rutherford et al., 2008; Neumann et al., 2009; Valdmanis et al., 2009; Kirby et al., 2010; Fiesel et al., 2011).

A TDP-43 é uma ribonucleoproteína altamente conservada que expressa-se numa variedade de tecidos e tipos celulares, inclusive nos neurônios. Ela possui dois sítios de reconhecimento de RNA e um domínio C-terminal rico em glicina, este promotor de interação proteína-proteína. Suas funções incluem o transporte e estabilização do RNA mensageiro, a regulação da transcrição e *splicing* alternativo. Ainda, a TDP-43 está implicada na biogênese de microRNAs de diversos genes e na ligação do DNA e do RNA com outras proteínas. Através destas funções, desregulações nos processos celulares relacionados à TDP-43, fazem dela uma proteína potencialmente envolvida na fisiopatologia da DLFT-TDP, da DFT-ELA e da ELA familiar e esporádica (Buratti e Baralle, 2008; Lillo e Hodges, 2009; Borroni et al., 2010).

1.3 Doença de Alzheimer

As duas principais características neuropatológicas da DA são as placas extracelulares constituídas pelo peptídeo beta-amilóide ($A\beta$) e os emaranhados neurofibrilares (ENF) intracelulares de proteína tau hiperfosforilada (Ross e Poirier, 2004; Hampel et al., 2011; Karantzouls e Galvin, 2011; Reitz, 2011).

O peptídeo $A\beta$ resulta da clivagem de um precursor maior, a proteína precursora da amilóide (APP). A APP, em seu processamento, sofre ação proteolítica da α -secretase, gerando um fragmento com 40 aminoácidos ($A\beta_{40}$) que é o mais comum, produzido pela chamada via não-amiloidogênica. O precursor sofre também ação da β -secretase, e mesmo da γ -secretase, resultando em uma espécie com 42 aminoácidos, a $A\beta_{42}$, esta que é neurotóxica, pela chamada via amiloidogênica. Segundo a hipótese da cascata amilóide, o evento central na DA é o desequilíbrio entre a produção e a remoção de $A\beta_{42}$ no cérebro, levando a formação de placas insolúveis, que por sua vez, desencadeiam uma cascata de alterações deletérias que resultam na morte neuronal, provocando a manifestação dos sintomas. Então, ainda que a DA seja uma doença geneticamente complexa e heterogênea, os estudos genéticos da DA familiar fornecem fortes evidências que apóiam a hipótese da cascata amilóide (Bird, 2008; Pimplikar, 2009; Galimberti e Scarpini, 2010).

Cerca de 1 a 6% de todos os casos da DA são de início precoce, com manifestação dos primeiros sintomas antes dos 65 anos de idade. Aproximadamente 60% destes casos são do tipo familiar, sendo 13% com herança autossômica dominante. Nestes casos há mais de 260 mutações raras já identificadas em três genes, identificados como gene da proteína precursora da amilóide (APP) e genes da presenilina 1 (PSEN1) e 2 (PSEN2). As presenilinas são componentes do complexo proteolítico γ -secretase que, juntamente com β -secretase, geram o $A\beta_{42}$ a partir da APP. Deste modo, a identificação de mutações nos genes codificadores tanto do substrato quanto das enzimas chave para a geração de $A\beta$ é sido importante na caracterização da fisiopatologia da DA (Bird, 2008; Rademakers e Rovelet-Lecrux, 2009; Pimplikar, 2009).

Quanto à idade de aparecimento dos sintomas, a DA divide-se em DA de início tardio, em que os sintomas se iniciam após os 65 anos e DA de início precoce, quando o início dos sintomas ocorre antes dos 65 anos de idade. A maior parte dos

casos (75 a 85%) em que a DA se inicia tardiamente é do tipo esporádico da doença, porém há ocorrência de casos familiares que tem início tardio. A manifestação tardia da DA resulta da interação de vários genes de susceptibilidade e fatores ambientais, o que mostra origem complexa e multifatorial da doença. Deste modo, até o momento, o alelo $\epsilon 4$ do gene da apolipoproteína E (*APOE*) foi o único fator de risco genético que mostrou associação consistente com a DA esporádica de início tardio em vários estudos genéticos em diversos grupos étnicos. Farrer et al. (1997), em estudo de metanálise, mostraram um risco três vezes maior de desenvolver a DA em indivíduos portadores de apenas uma cópia do alelo $\epsilon 4$ do *APOE* e quinze vezes maior em indivíduos homozigotos para este mesmo alelo. Através de mecanismos desconhecidos para o desenvolvimento da doença, o alelo $\epsilon 4$ do *APOE* modifica o período de aparecimento da doença, deslocando-o para uma idade mais precoce (Khachaturian et al., 2004; Ojopi et al., 2004; Bird, 2008; Bekris et al., 2010; Galimberti e Scarpini, 2010).

O gene *APOE* localiza-se no cromossomo 19 (19q13.2), especificamente em um *cluster* com outros genes que sintetizam outras apolipoproteínas, descritos como *APOC1*, *APOC2* e *APOC4*. O gene *APOE* é formado por quatro éxons distribuídos ao longo de 6.740 nucleotídeos no genoma humano que codificam a apolipoproteína E (ApoE) com 317 aminoácidos (34kDa). Este gene possui três alelos ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, e $\epsilon 4$), os quais são definidos por dois polimorfismos (rs429358 e rs7412) de um único nucleotídeo que são codificados pelo éxon 4 do gene (Ojopi et al., 2004; Mahley e Huang, 2006; Bekris et al., 2010).

Os alelos do *APOE* codificam três isoformas protéicas conhecidas como E2, E3 e E4. Destas, a ApoE3 é a isoforma mais frequente da proteína e contém o aminoácido cisteína na sua posição 112 e o aminoácido arginina na posição 158. A isoforma ApoE2 contém cisteína em ambas as posições e a isoforma ApoE4 possui arginina nas duas posições. As posições dos aminoácidos cisteína e arginina afetam a estrutura tridimensional da proteína e, conseqüentemente, as propriedades de ligação das isoformas pelos lipídios. A ApoE3 e a ApoE2 se ligam preferencialmente a lipoproteínas de alta densidade (HDL). Na ApoE4, a presença da arginina em ambas as posições altera a estrutura da proteína de tal forma que ela passa a se ligar

preferencialmente a lipoproteínas de baixa densidade (VLDL) (Ojopi et al., 2004; Mahley e Huang, 2006; Bekris et al., 2010).

A glicoproteína ApoE é sintetizada principalmente pelas células gliais no sistema nervoso, notavelmente nos astrócitos, microglia e células de Schwann. No SNC, a ApoE está envolvida na mobilização e redistribuição do colesterol, bem como na manutenção e reparo neuronal. Também está associada aos mecanismos de plasticidade sináptica. Enquanto o alelo $\epsilon 4$ é um fator de risco bem estabelecido para o desenvolvimento da DA, o alelo $\epsilon 2$ relaciona-se a um efeito protetor contra o desenvolvimento da doença. Tais correlações não foram observadas para o alelo $\epsilon 3$. Vários mecanismos são propostos para explicar os efeitos do alelo $\epsilon 4$ do *APOE* na DA. Embora este alelo esteja fortemente ligado à doença, seu real envolvimento na patogênese da DA permanece desconhecido (Ojopi et al., 2004; Mahley e Huang, 2006; Rassas et al., 2012).

Sabe-se que ao longo de toda a vida, principalmente nas idades mais avançadas, os neurônios devem ser remodelados e reparados para manter as conexões sinápticas. A ApoE, através da sua função de transporte de lípidos, é um fator importante nesse processo. As isoformas ApoE2 e a ApoE3 atuam na manutenção e no reparo de células neuronais de modo bastante eficaz, entretanto a ApoE4 mostra-se bem menos eficiente nesse papel (Mahley e Huang, 2006).

Além disso, as interações da ApoE4 com o peptídeo A β podem aumentar a deposição e a não remoção da A β em placas. De fato, a quantidade das placas de A β é maior nos portadores do alelo $\epsilon 4$ e a presença deste alelo aumenta a carga de A β fibrilar em pessoas mais velhas cognitivamente normais. Portanto, o papel da ApoE4 na reparação neuronal, na deposição de A β e no aumento da carga de A β fibrilar oferecem pistas do envolvimento do alelo $\epsilon 4$ na patogênese da DA (Mahley e Huang, 2006; Rademakers e Rovelet-Lecrux, 2009).

Além do gene *APOE*, há outros já relatados e relacionados com a DA como é o caso dos genes *PICALM*, *CRI*, *CLU*, *BIN1*, *ABCA7*, *MS4A6A*, *EPHA1*, *CD33*, e *CD2AP* (Hong et al., 2012). O entendimento da participação destes genes começa a ser explorado na literatura.

Dessa forma, o estudo da influência de genes em duas demências bastante prevalentes na população mundial mostra-se essencial tanto para melhor

compreensão das doenças quanto para auxiliar na busca de possíveis tratamentos mais eficazes.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar a presença e o tipo de mutação no gene *TARDBP* em pacientes com DLFT e DFT-ELA e implementar uma metodologia mais sensível para determinação dos polimorfismos do *APOE* em pacientes com DA provável.

2.2 Específicos

- Implementar a metodologia para a análise de mutação no gene *TARDBP* a partir de amostras de sangue de pacientes com DLFT e com DFT-ELA.
- Iniciar o Banco de Dados do Perfil Genético da DLFT no Brasil (BPGDLFT-Brasil) para correlações futuras com os dados histopatológicos do tecido cerebral pós-morte.
- Calcular as frequências genotípicas e alélicas do *APOE* dos pacientes de DA provável e comparar tais frequências com dados da literatura.

3. MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O procedimento foi explicado detalhadamente para todos os candidatos ao estudo. Aqueles que aceitaram participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO A). Caso o paciente não tivesse capacidade de compreensão, o mesmo processo foi realizado com seu representante legal.

O projeto, que incluiu os pacientes de DLFT e de DA, foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (nº 0252/10). (ANEXO B).

3.2 Casuística

Foram estudados 47 indivíduos com diagnóstico de DLFT, com média de idade de 60,9 anos, incluindo 30 com vcDFT, 6 com DS, 8 com APNF e 3 com DFT-ELA; e 30 indivíduos com diagnóstico de DA provável, com média de idade de 74,3 anos (Tabela 1). Para a seleção dos pacientes de DLFT, DFT-ELA e DA foram utilizados os critérios do Neary et al. (1998), do Strong et al, (2009) e do NINCDS/ADRDA (*National Institute of Neurological and Communicative Diseases and Stroke / Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*), respectivamente.

Tabela 1 - Características da amostra

Categoria	DLFT	DA
Total (número de sujeitos)	47	30
Senil	16	22
Pré-Senil	31	8
Sexo - número (%)		
Masculino	22 (46,8)	11(36,7)
Feminino	25 (53,3)	19 (63,3)
Idade - média ($\pm$DP)	60,9($\pm$ 9,4)	74,3 ($\pm$ 11,2)

Os pacientes possuem registro no ambulatório do Grupo de Neurologia Cognitiva e do Comportamento ou foram encaminhados por médicos neurologistas que compõem este grupo e pertencem à Clínica Neurológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.3 Extração de DNA

Após a coleta de 5 a 10 mL de sangue periférico de cada paciente, o DNA genômico foi extraído de acordo com protocolo adaptado (Miller et al., 1988), brevemente descrito a seguir. O sangue foi primeiramente diluído com solução de lise de células (NH_4Cl , HCO_3 e EDTA 0,2M) chegando a um volume final de 45 mL, seguido de incubação no gelo por 30 minutos para a lise das hemácias. As amostras foram centrifugadas por 25 minutos à 2000 rpm e o sobrenadante foi descartado. A solução de lise foi novamente adicionada ao sedimento, seguido por centrifugação de 10 minutos à 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 3 mL de solução de lise de núcleos (Tris-HCl, NaCl e EDTA 0,2M). A seguir, 300 μL de dodecil sulfato de sódio 10% (SDS) foram adicionados e, após cuidadosa homogeneização, 0,7 mg de proteinase K foram adicionados, seguido por incubação a 37°C até o dia seguinte. A extração foi reiniciada com adição de NaCl 6M e homogeneização rápida. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 30 minutos à 3000 rpm, o seu sobrenadante foi transferido para outro tubo e a amostra foi novamente centrifugada por 20 minutos à 3000 rpm. O sobrenadante final foi transferido para um tubo de vidro para precipitação do DNA por etanol absoluto. O DNA precipitado foi lavado em etanol 70%, seco por 30 minutos e eluído em TE (Tris 1,0 M e EDTA 0,5 M) e incubado à 65°C por 40 minutos. As amostras de DNA foram estocadas à 4°C.

Após a extração do DNA, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop 1000, *Thermo Scientific*). Amostras com razão de absorbância entre 1,8 e 2,0 foram consideradas aceitáveis. Em seguida, as amostras foram diluídas para a concentração final de 50 ng/ μL para que pudessem ser utilizadas nas etapas subsequentes. As amostras de DNA extraídas e não utilizadas neste estudo foram estocadas no Banco de Dados do Perfil Genético da DLFT no Brasil (BPGDLFT-Brasil) em nossa Instituição para estudos futuros.

3.4 Sequenciamento do gene *TARDBP*

A reação em cadeia da polimerase (PCR) de cada um dos éxons consistiu de 10 mM de solução Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 2,5 mM de cada desoxinucleotídeo

(*Promega*), 1,5 mM de $MgCl_2$, 1,5 μM de cada iniciador (*Integrated DNA Technologies*), 1 U de *Taq* polimerase (*Promega*) e 300 ng de DNA, com volume final ajustado para 25 μl com H_2O livre de nucleotídeos.

A ciclagem foi realizada no termociclador *Mastercycler gradient* (*Eppendorf*) e constituiu-se em: 94°C por 5 minutos, para desnaturação da dupla fita de DNA, seguida por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos para desnaturação, 30 segundos em temperatura específica de anelamento para cada par de iniciadores, e, 72°C por 45 segundos para extensão das novas fitas, finalizado por extensão final de 72°C por 7 minutos. A tabela 2 apresenta os pares de iniciadores utilizados em todas as reações (Kabashi et al., 2008; Sreedharan et al., 2008).

Tabela 2 - Pares de oligonucleotídeos usados para amplificar a região codificadora do gene *TARDBP*

Éxon	Iniciador de avanço (5'-3')	Iniciador de retrocesso (5'-3')	Anelamento	Tamanho
1	TCAATCTTCAGCTTTCAGGC	TGCCAGGACCTAACGACGCT	56,8°C	417pb
2	AGAACTCTGACATGGTTTGGG	TGCCACCAAAAAGAGGCTAAG	55,0°C	384pb
3	TCACTTCTTGCCAAGTTTTCAG	AGTATGGGCCAGGAGTTTG	60,0°C	391pb
4	CACTGCATCCAGTTGAAACC	GGATTTTCATGAACACACCCTG	54,4°C	322pb
5	ATCCAAGGCGAATGATTTTG	GAGAAATTACCTAATTACCTGGGAC	59,0°C	576pb
6A	TGCTTGTAATCTAAGTTTGTGTC	GCTGGCTGGCTAACATGC	54,7°C	359pb
6B	TGGTGGGATGAACTTTGGTG	TGCTGAATATACTCCACACTGAAC	60,0°C	413pb

Após as amplificações, os produtos de PCR foram purificados com enzima *ExoSAP-IT* (*GE Healthcare*) conforme o protocolo do fabricante modificado. O produto de PCR (5 μL) foi incubado com 2 μL de *ExoSAP-IT* no termociclador a 37°C durante 1 hora e, em seguida, a 85°C por 15 minutos para desnaturação da enzima.

Após serem purificados, os produtos de PCR foram sequenciados em sequenciador automático. Os sequenciamentos foram realizados no Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM-25) pela bióloga molecular responsável em sequenciador *ABI 3130XL Genetic Analyzer* (*Life Technologies*) de acordo com as recomendações do fabricante do equipamento.

As análises das sequências foram feitas utilizando-se o software *Mutation Surveyor – DNA Variant Analysis Software V. 3.2*.

3.5 Genotipagem do gene *APOE*

As análises dos polimorfismos do gene *APOE* foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Calero et al. (2009), que se utiliza de PCR em tempo real (qPCR) para determinação dos genótipos. As sequências dos iniciadores utilizados nas reações podem ser encontradas na Tabela 3.

Tabela 3 - Sequências de oligonucleotídeos usados para qPCRs da região polimórfica do éxon 4 do gene *APOE* desenhados a partir de sequência humana do mesmo gene (NG_007084.2, NCBI reference assembly sequence)

Iniciadores	Sequência
APOE_112C	CGGACATGGAGGACGTGT
APOE_112R	CGGACATGGAGGACGTGC
APOE_158C	CTGGTACACTGCCAGGCA
APOE_158R	CTGGTACACTGCCAGGCG

Três reações foram feitas para cada paciente (uma para cada alelo possível – $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) e as combinações entre os iniciadores e o alelo correspondente podem ser encontradas na Tabela 4. Cada reação consistiu 6,25 μ l de 2X *Maxima® SYBR Green qPCR Master Mix* (Fermentas), 375 nM de cada iniciador (Tabela 2) e 7,5 ng de DNA genômico, com volume final completado para 12,5 μ l com H₂O livre de nucleotídeos. A ciclagem consistiu-se de 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 62°C por 1 minuto.

Tabela 4 - Combinação de *primers* de acordo com cada reação correspondente para cada alelo do gene *APOE*

Alelo	Combinação de <i>primers</i>
$\epsilon 2$	APOE_112C e APOE_158C
$\epsilon 3$	APOE_112C e APOE_158R
$\epsilon 4$	APOE_112R e APOE_158R

Todas as reações foram realizadas no termociclador *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Life Technologies) no Laboratório de Patologia Molecular (LIM-22).

Ao final das reações, três valores de *Ct* (do inglês, *Cycle threshold*) foram obtidos para cada amostra, uma para cada alelo. O genótipo foi determinado a partir dos cálculos das diferenças entre estes *Cts*. Quando um determinado alelo apresentou *Ct* mais baixo que todos os demais em pelo menos 5 ciclos, o indivíduo foi considerado homozigoto para este alelo. Entretanto, quando houve diferença de

menos de 5 Cts entre dois alelos, o indivíduo foi considerado heterozigoto para os dois alelos em questão (Calero et al., 2009).

3.6 Metanálise

Para a metanálise, buscamos através do *Medline* os estudos realizados no Brasil para genotipagem do *APOE* na DA no período entre janeiro de 2000 a dezembro de 2011. Quatro estudos de *APOE* relacionados à DA no Brasil foram encontrados, especificamente os de de-Andrade et al., 2000; Souza et al., 2003; Bahia et al., 2008 e de-Almada et al., 2011. Entretanto, o estudo de de-Andrade et al. (2009) não foi utilizado para a metanálise por não conter informações claras sobre critérios de seleção dos controles utilizados. Deste modo, a partir dos três estudos restantes, os quais utilizaram a metodologia descrita por Hixson e Vernier (1990), duas análises diferentes foram realizadas. A primeira análise consistiu na metanálise dos outros três estudos a fim de confrontar informações já encontradas na população brasileira sobre o risco atribuído à presença do alelo $\epsilon 4$ na DA. Posteriormente, o *pool* dos controles apresentados por tais estudos ($n=360$) foram comparados aos resultados dos pacientes recrutados pelo nosso grupo ($n=30$). Nesta fase, objetivamos verificar se a metodologia implantada e utilizada para genotipagem foi capaz de fornecer resultados compatíveis aos dos demais estudos para uma população semelhante. Em todos os estudos selecionados, verificamos que os controles estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). A Tabela 5 apresenta as descrições e desenhos experimentais dos estudos incluídos na metanálise.

Tabela 5 - Descrição dos dados populacionais dos estudos incluídos na metanálise

Estudo	Casos			Controles		
	n	Idade - média ($\pm$ DP)	Critério diagnóstico	n	Idade - média ($\pm$ DP)	Critério diagnóstico
Souza et al.	68	71,5	NINCDS-ADRDA	58	70,0	NC ¹
Bahia et al.	120	75.2 ($\pm$ 9.2)	NINCDS-ADRDA	120	72.5 ($\pm$ 8.6)	MMSE ² e Teste de Fluência Verbal
de-Almada et al.	82	82.2 ($\pm$ 7.5)	NINCDS-ADRDA	182	78.3 ($\pm$ 8.3)	MMSE ^{2,3} e CDR ⁴

¹Não consta.

²Do inglês, *Mini-Mental State Examination*.

³Score maior que 28 no referido teste.

⁴Do inglês, *Clinical Dementia Rating Scale*.

3.7 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada no programa *R* V.2.13. Para metanálise e para computar razão de chance (do inglês, *odds ratio*) foi empregada a estatística de DerSimonian-Laird (Verpillat et al., 2002), contida no pacote *rmeta* do ambiente *R*. O teste exato de Fischer foi utilizado para comparar os dados do pacientes deste estudo com os dados dos controles da literatura brasileira.

4. RESULTADOS

4.1 Sequenciamento do *TARDBP*

Todos os éxons (1 a 6) do gene *TARDBP* de todos os 47 pacientes de DLFT foram sequenciados e uma mutação do tipo sentido trocado (do inglês, *missense*), ou seja, quando a troca de um nucleotídeo resulta em troca de um aminoácido na proteína, foi identificada em uma região codificante do DNA de um dos pacientes analisados. Para a confirmação do achado, a mesma região foi sequenciada, neste paciente mais duas vezes.

A mutação encontrada está localizada no éxon 6 (Figura 1) do gene *TARDBP*. Tal variante consiste em substituição de uma única base (A→G) que acarreta na troca de um aminoácido por outro (isoleucina→valina) na proteína. A variante está localizada na posição g.14935A>G do genoma, c.1147A>G do cDNA e p.I383V da proteína.

FONTE: Borroni et al., 2010 (adaptado).

Figura 1 – Localização da mutação encontrada (I383V) no gene *TARDBP*.

A localização da mutação I383V no genoma (NG_008734.1) e no cDNA (NM_007375.3) está registrada no GenBank e na proteína (NP_031401.1) está também incluída no GenPept. A variante identifica-se como rs80356740 segundo o banco de dados de simples polimorfismos (dbSNP) e é identificada como patogênica.

A mutação I383V foi identificada em heterozigose (Figura 2) em um paciente do sexo masculino, de 54 anos de idade e com diagnóstico clínico de DS. Há dois anos, o paciente em questão começou a apresentar dificuldade em nomear objetos e pessoas, além de grande apatia com momentos de irritação. A evolução passou a cursar com desinibição (cumprimentava desconhecidos na rua) e comportamento obsessivo (limpeza e religiosidade). Como antecedente, em 2005, teve sintoma de apatia que reverteu ao ser medicado por psiquiatra. Ainda, o pai,

todos os quatro tios paternos e o avô paterno apresentaram quadro demencial que se iniciou com idade que variava de 45 a 70 anos, além disso, há também casamentos co-sanguíneos. Os resultados de avaliações neuropsicológicas apontaram prejuízos graves da atenção, funções executivas, memória e linguagem. Apesar de apresentar desempenho médio-inferior em teste de definição de palavras, observou-se grave comprometimento do acesso semântico em tarefa de nomeação e de fluência verbal semântica. A ressonância de crânio mostra atrofia temporal bilateral. Tomados em conjunto, esses dados permitiram diagnosticar o quadro do paciente como Demência Semântica. Destaca-se que não há registros de análise gênica anterior no paciente e em seus familiares.

Figura 2 – Cromatogramas. (A) Sequência referência. (B) Sequência *forward* do paciente. (C) Sequência *reverse* do paciente. A seta vermelha indica a posição g.14935, onde ocorreu a troca do nucleotídeo (A→G).

Diante desse achado, a frequência de mutações no gene *TARDBP* neste estudo é de 2,12%.

4.2 Genotipagem do *APOE*

A partir dos dados obtidos pela genotipagem do *APOE* de 30 pacientes com DA provável, as frequências genotípicas foram calculadas. Estas representadas pelo quociente entre o número de pacientes com determinado genótipo e o número total de pacientes. As frequências alélicas, representadas pelo quociente entre o número observado para um determinado alelo e o número total de alelos, também foram calculadas. As frequências genotípicas dos pacientes de DA podem ser observadas na

Tabela 6. O genótipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ foi observado na maior parte dos casos (60%), seguido dos genótipos $\epsilon 3/\epsilon 4$ (26,7%), $\epsilon 2/\epsilon 3$ e $\epsilon 4/\epsilon 4$ (ambos com 6,7%). Não foi encontrado nenhum paciente com os genótipos $\epsilon 2/\epsilon 2$ e $\epsilon 2/\epsilon 4$.

Tabela 6 - Distribuição das frequências genotípicas do *APOE* em 30 indivíduos com DA provável

Genótipos <i>n</i> (%)					
$\epsilon 2/\epsilon 2$	$\epsilon 2/\epsilon 3$	$\epsilon 2/\epsilon 4$	$\epsilon 3/\epsilon 3$	$\epsilon 3/\epsilon 4$	$\epsilon 4/\epsilon 4$
0	2 (6,7%)	0	18 (60%)	8 (26,7%)	2 (6,7%)

Em relação às frequências alélicas dos pacientes de DA, o alelo $\epsilon 3$ foi observado como o mais frequente (76,7%), seguido pelos alelos $\epsilon 4$ (20%) e $\epsilon 2$ (3,3%), como demonstrado na Tabela 7.

Tabela 7 - Distribuição das frequências alélicas do *APOE* em 30 indivíduos com DA provável

<i>n</i>	Alelos (%)		
	$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$
60	2 (3,3%)	46 (76,7%)	12 (20%)

A comparação entre os dados obtidos por este estudo e os dados publicados por Souza et al., 2003; Bahia et al., 2008 e de-Almada et al., 2011, a partir de amostras da população brasileira, foi realizada através de metanálise a fim de investigar a associação dos alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ com a DA na referida população. A análise mostrou uma diminuição na frequência do alelo $\epsilon 2$ em pacientes com DA quando comparados aos controles ($OR[\epsilon 2 \text{ vs } \epsilon 3] = 0,39$; 95% IC = 0,22-0,69; $p=0,51$) e um aumento na frequência do alelo $\epsilon 4$ em pacientes com DA também quando comparados aos controles ($OR[\epsilon 4 \text{ vs } \epsilon 3] = 3,15$; 95% IC = 2,35-4,22; $p=0,54$). Interessantemente, o alelo $\epsilon 3$ apresentou comportamento semelhante ao alelo $\epsilon 2$ nesta análise ($OR[\epsilon 3 \text{ vs } \epsilon 3] = 0,48$; 95% IC = 0,37-0,63; $p=0,85$) (Figura 3). Para nenhum dos alelos foi observada diferença estatística significativa.

Figura 3 – Metanálise dos alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ em pacientes com DA (*Forest plot*). Estatística DerSimonian-Laird: ($\epsilon 2$) qui-quadrado (χ^2)=1,33, p =0,51; ($\epsilon 3$) qui-quadrado (χ^2)=0,32, p =0,85; ($\epsilon 4$) qui-quadrado (χ^2)=1,21, p =0,54. As linhas horizontais representam 95% de intervalo de confiança para a razão de chance. Razões de chance maiores que 1 representam chance aumentada para ocorrência de um determinado evento, por outro lado, quando esta razão apresenta valores menores que 1, pode-se considerar que as chances do evento ocorrer são menores.

Após realização da metanálise para avaliação do perfil geral dos alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ nos estudos brasileiros, foram calculadas as frequências e os intervalos de confiança (IC) do *pool* de pacientes de DA e do *pool* de controles destes estudos. Adicionalmente, os dados das frequências alélicas obtidas para o presente estudo foram comparados às frequências alélicas obtidas para o *pool* dos controles dos três estudos da metanálise. Todas as frequências alélicas calculadas e seus intervalos de confiança (IC) encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 - Distribuição das frequências alélicas e do *APOE* em *pool* de pacientes com DA e em *pool* de indivíduos controles de estudos brasileiros, e ainda em pacientes com DA do presente estudo

Grupos	Alelos % (IC)		
	$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$
<i>Pool</i> DA	2,96% (0,015-0,043)	66,2% (0,623-0,702)	30,7% (0,268-0,346)
<i>Pool</i> controles	7,77% (0,058-0,097)	79,0% (0,760-0,820)	13,1% (0,107-0,156)
Pacientes DA	3,33% (0,012-0,078)	76,67% (0,659-0,873)	20,0% (0,098-0,301)

O teste de exato de Fischer apontou para uma possível tendência ao risco aumentado na presença do alelo $\epsilon 4$ em pacientes do nosso estudo (OR=1,51; 95% IC = 0,715-2,97; p =0,254) quando comparados ao *pool* de controles dos estudos brasileiros e para uma tendência ao efeito protetor do alelo $\epsilon 2$ (OR=0,429; 95% IC =

0,049-1,69; $p=0,305$) enquanto que para o ε_3 não foi observada diferença em relação ao controle (OR=0,97; 95% IC = 0,63-1,47; $p=0,91$).

5. DISCUSSÃO

5.1 Sequenciamento do *TARDBP*

Diversas mutações no gene *TARDBP* foram descritas recentemente na literatura, sendo que a maior parte delas em casos de ELA (familiar e esporádica) e DFT-ELA. Considerando os estudos anteriores, a frequência de mutações no *TARDBP* foi de 3,6% em casos de ELA familiar, 1% em casos de ELA esporádica e 2,6% em DLFT (Borroni et al., 2010; Xiong et al., 2010).

No presente estudo, após o sequenciamento dos 6 éxons do gene *TARDBP* de cada um dos 47 pacientes de DLFT, a mutação g.14935A→G foi encontrada em um paciente com DS de 54 anos. Neste paciente, uma única substituição de base no gene da TDP-43 foi identificada. A mutação em questão, já descrita em ELA, determinou a troca do aminoácido isoleucina por valina na posição 383 da proteína (I383V) (Rutherford et al., 2008).

A frequência de mutação de 2,12% no gene *TARDBP* do presente estudo, está de acordo com os dados já publicados para mutações nesse gene em ELA (1-3,6%) e em DLFT (2,6%) (Borroni et al., 2010; Xiong et al., 2010).

Recentemente, Borroni et al. (2010), ao sequenciar o gene *TARDBP* em 190 pacientes de DLFT, incluindo pacientes com DFT-ELA, identificaram seis variações genéticas, cinco destas em pacientes com vcDFT e uma em um paciente com DFT-ELA. Duas dessas mutações foram encontradas no éxon 6 (*hotspot*), levando à substituição de aminoácidos (*missense*). Na primeira, houve substituição do aminoácido arginina por serina na posição 267 da proteína [c.800 A→G (N267S)]. Na segunda, o aminoácido metionina foi substituído por valina na posição 359 [c.1075 A→G (M359V)]. Em ambos os casos, as substituições são patogênicas (Borroni et al., 2010). No éxon 5 foi encontrada uma substituição sinônima [c.642 C→T (Y214Y)]. Na região intrônica (*downstream* ao éxon 4) foi encontrada uma variação (c.588 T→C). Outra mutação sinônima não patogênica foi encontrada no éxon 2 [c.198 T→C (A66A)]. Finalmente, uma troca de nucleotídeos (c.-122 G→A) foi encontrada em região não traduzida (5'-UTR). Esta última detectada em um paciente com DFT-ELA.

Interessantemente, a mutação identificada pelo presente estudo é inédita para pacientes com DLFT, tendo sido descrita anteriormente apenas para 1 paciente com ELA familiar. Além disso, também não há na literatura descrição de mutação em paciente com DS sem evidência clínica de ELA (Rutherford et al., 2008; Benajiba et al., 2009). Ressalta-se que não há registros nos formulários do paciente o estudo da possível forma familiar neste paciente com a variante semântica da DLFT e em seus familiares, a despeito do relato da presença de quadro demencial no avô e em tios paternos.

Nota-se que apesar das várias evidências da contribuição patogênica das mutações no *TARDBP* na ELA esporádica e familiar, poucos estudos avaliaram especificamente o papel dessas mutações na DLFT (Kovacs et al., 2009; Gallone et al., 2009; Borroni et al., 2010;). Até o momento, as variações genéticas encontradas no gene *TARDBP* somente foram descritas em casos de DFT-ELA, de DS cursando com ELA e da vcDFT. Nenhum desses estudos encontrou qualquer alteração em um caso de DS ou APNF sem ELA (Benajiba et al., 2009; Borroni et al., 2010). Portanto, nosso achado é singular e de grande importância.

Desta forma, nosso estudo sugere que mutações no gene *TARDBP* podem ser patogênicas em casos do espectro da DLFT com ou sem ELA e que outros estudos que investiguem a presença dessas mutações na DLFT precisam ser realizados.

5.2 Genotipagem do *APOE*

O alelo $\epsilon 4$ é reconhecido como um fator de risco genético para o desenvolvimento da DA de início tardio por mais de vinte anos. Entretanto, o risco atribuído ao $\epsilon 4$ varia por região e raça. Provavelmente por esse motivo, as frequências alélicas do *APOE* mostram-se bastante heterogêneas entre as várias populações estudadas. Nota-se que a relação entre os alelos apresenta um padrão constante nos diversos continentes (África, Europa, Ásia, Oceania e populações de americanos nativos), sendo o alelo $\epsilon 3$ o mais frequente, seguido pelos alelos $\epsilon 4$ e $\epsilon 2$ (Hallman et al., 1991; Corbo et al., 1999; Hill et al., 2007; Crean et al., 2011; Ward et al., 2012).

Estudos publicados relatam altas frequências do alelo $\epsilon 4$ na Oceania (26,0-36,8%) e baixas em populações asiáticas (7,1-24%) quando comparadas às demais populações. Na Europa, a frequência do $\epsilon 4$ aumenta com a latitude, sendo portanto baixa no sul do continente (5,2% na Itália) e alta nas regiões do norte (31,0% na Noruega). Por sua vez, as populações africanas são as que apresentam maior variação (8,5% em marroquinos e 40,7% entre pigmeus). Em nativos americanos a frequência do $\epsilon 4$ variou entre 8,9 e 28,0% (Corbo et al., 1999; Crean et al., 2011).

Interessantemente, a análise das frequências do alelo $\epsilon 4$ em pacientes com DA permitem observar padrão muito parecido com o da população geral, porém com valores mais expressivos, o que reforça a hipótese de o alelo $\epsilon 4$ ser um fator de risco importante no caso de DA de início tardio (Corbo et al., 1999; Crean et al., 2011).

De maneira geral, a maior parte desses estudos utilizou a metodologia descrita por Hixson e Vernier (1990) para detectar os polimorfismos do gene *APOE* e genotipar os indivíduos de suas amostras. Tal método consiste no uso da técnica de PCR-RFLP (do inglês, *PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism*).

No que se refere à população brasileira, os estudos também têm utilizado o método de PCR-RFLP. Os dados obtidos por metanálise dos estudos realizados no Brasil apontam uma frequência de 30,7% (IC=0,268-0,346) para o alelo $\epsilon 4$ em pacientes com DA e de 13,1% (IC=0,107-0,156) em controles (45, 62, 63).

No presente estudo, como já dito, metodologia mais recente para a genotipagem do *APOE* foi utilizada. Com ela, obtivemos uma frequência de 20% para o $\epsilon 4$ em pacientes com DA, semelhante à frequência do *pool* de pacientes de DA da metanálise feita a partir dos dados da população brasileira e publicados por Souza et al., 2003; Bahia et al., 2008 e de-Almada et al., 2011. E embora o IC do presente estudo seja maior, isso provavelmente ocorreu devido à diferença do número de pacientes de DA ($n=30$) e o número de pacientes do *pool* considerado na metanálise ($n=270$).

Além disso, quando comparamos estatisticamente os dados dos pacientes de DA deste estudo com os dados obtidos do *pool* de controles, observa-se que apesar de o valor de p ser maior do que 0,05, a OR apresenta-se na possível tendência dos estudos brasileiros já publicados, com risco aumentado para DA na presença do alelo

$\epsilon 4$ e diminuído na presença do alelo $\epsilon 2$. Provavelmente, o aumento do número amostral permitiria o aparecimento da diferença estatística.

Apesar de ser utilizado tradicionalmente, o método de genotipagem do *APOE* por PCR-RFLP é demorado e bastante susceptível a erros devido à possível incompleta digestão do fragmento com enzimas de restrição e à dificuldade na interpretação dos resultados (Hixson e Vernier, 1990). Entretanto, o método de PCR em tempo real realizado neste estudo mostra-se como uma alternativa rápida (aproximadamente 2 horas), simples, sensível, eficaz (alto custo-benefício) e reprodutível de genotipagem do *APOE*. A alta especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade do método realizado neste estudo foram analisadas previamente. Além disso, este método não requer processamento pós-PCR e tem um altíssimo rendimento, podendo ser utilizado quando há uma quantidade muito pequena de DNA genômico (cerca de 7ng). Isso torna este método particularmente mais adequado em casos onde a quantidade de sangue periférico coletado é pequena, fato frequente entre idosos (Calero et al., 2009).

Portanto, por ser um método bastante confiável e rápido, pode ser prontamente utilizado em serviços públicos de atendimento no âmbito da pesquisa para fins de estudos que envolvam pacientes com DA, além de outras doenças em que a apolipoproteína E esteja envolvida.

6. CONCLUSÃO

Este estudo encontrou uma mutação no gene *TARDBP* em paciente com DLFT, estando dentro da frequência esperada, de acordo com a literatura. Tal mutação (g.14935A>G) é pioneiramente descrita em paciente com a variável semântica da DLFT.

A metodologia para a genotipagem do *APOE* implementada em nosso laboratório e utilizada para determinar os polimorfismos de nossos pacientes conseguiu expressar resultados de frequências que corroboram os dados da literatura brasileira. Entretanto, um número amostral maior é necessário para o detalhamento dos resultados.

A sistematização do Banco de Dados do Perfil Genético da DLFT no Brasil (BPGDLFT-Brasil) será útil para o estudo futuro de novas mutações.

ANEXO A

1

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

MODELO DE 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 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 NASCIMENTO.:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)
-

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA ... Análise da presença e tipo de mutação dos genes da progranulina e da TDP-43 em pacientes com Degeneração Lobar Frontotemporal e com Doença de Alzheimer alelo tipo específico.

PESQUISADORES : Professores Ricardo Nitrini e Gerson Chadi.

CARGO/FUNÇÃO: Docentes. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 17011 (Ricardo Nitrini); 53368 (Gerson Chadi)

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Neurologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

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

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 48 meses

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

Nós estamos realizando uma pesquisa em que iremos verificar se existem alterações genéticas chamadas mutações e polimorfismos, e também modificações no nível sanguíneo de duas proteínas denominadas progranulina e TDP-43, em pessoas que apresentam declínio da atividade intelectual ou distúrbios do comportamento. Para esse fim, iremos colher amostra de sangue (16 ml) por meio de punção de veia superficial visível na região do braço. A coleta será realizada no Laboratório Central do IC-HCFMUSP por profissional especializado. Este exame é feito com uso de agulha descartável e apresenta desconforto ou risco mínimo. Às vezes poderá ser evidenciado dor e hematoma no local da punção venosa, porém de pequena intensidade e passageiros. O material será então enviado ao nosso laboratório para as análises. Você está sendo convidado por ter sido diagnosticado com Degeneração Lobar Frontotemporal ou Doença de Alzheimer, ou ainda por não apresentar a doença em questão, mas fará parte do grupo de indivíduos controle.

Autorizo que o material colhido e não utilizado nesta 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 CAPESQ da FMUSP, garantindo sempre que os dados de estudos futuros serão confidenciais, sigilosos e privados e serão utilizados apenas para pesquisa.

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 o direito de retirar seu consentimento em qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. Os dados desse estudo serão utilizados apenas para pesquisa, de modo que a identidade dos participantes não será revelada. Em caso de intercorrências, você poderá entrar em contato com os Profs Drs. Ricardo Nitrini e Gerson Chadi, Professores Titulares 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 o 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 ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

*(para casos de pessoas impossibilitadas de compreender e/ou assinar este termo).

Assinatura do indivíduo do grupo controle** Data ____/____/____

** (para os casos de pessoas não doentes e que participam do grupo controle)

(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 ____/____/____

ANEXO B

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13/10/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0252/10**, intitulado: "**ANÁLISE DA PRESENÇA E TIPO DE MUTAÇÃO DOS GENES DA PROGRANULINA E DA TDP-43 EM PACIENTES COM DEGENERAÇÃO LOBAR FRONTOTEMPORAL E COM DOENÇA DE ALZHEIMER ALELO TIPO ESPECÍFICO**" apresentado pelo Departamento de **NEUROLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o **Sub projeto** da mestranda Thais Virginia Moura Machado Costa.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Ricardo Nitrini e Prof. Gerson Chadi**

Pesquisador (a) Executante: **Thaís Virgínia Moura Machado Costa e Leonel Tadao Takada**

CAPPesq, 14 de Outubro de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

7. REFERÊNCIAS

- Abreu ID, Forlenza OV, Barros HL. Demência de Alzheimer: Correlação entre memória e autonomia. *Rev Psiquiatr Clín.* 2005;32(3):6.
- Almeida OP. [Molecular biology of Alzheimer's disease: a light at the end of the tunnel?]. *Rev Assoc Med Bras.* 1997;43(1):77-81.
- Arvanitakis Z. Update on frontotemporal dementia. *Neurologist.* 2010;16(1):16-22.
- Bahia VS, Kok F, Marie SN, Shinjo SO, Caramelli P, Nitrini R. Polymorphisms of APOE and LRP genes in Brazilian individuals with Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2008;22(1):61-5.
- Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, Lindholm C, et al. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature.* 2006;24;442(7105):916-9.
- Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW. Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2010;23(4):213-27.
- Benajiba L, Le Ber I, Camuzat A, Lacoste M, Thomas-Anterion C, Couratier P, et al. TARDBP mutations in motoneuron disease with frontotemporal lobar degeneration. *Ann Neurol.* 2009;65(4):470-3.
- Bird TD. Genetic aspects of Alzheimer disease. *Genet Med.* 2008;10(4):231-9.
- Borroni B, Archetti S, Del Bo R, Papetti A, Buratti E, Bonvicini C, et al. TARDBP mutations in frontotemporal lobar degeneration: frequency, clinical features, and disease course. *Rejuvenation Res.* 2010;13(5):509-17.
- Bottino CM, Azevedo D, Jr., Tatsch M, Hototian SR, Moscoso MA, Folquitto J, et al. Estimate of dementia prevalence in a community sample from Sao Paulo, Brazil. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2008;26(4):291-9.
- Buratti E, Baralle FE. Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease. *Front Biosci.* 2008;13:867-78.
- Caixeta L, Nitrini R. [Clinical subtypes of frontotemporal dementia]. *Arq Neuropsiquiatr.* 2001;59(3-A):577-81.
- Calero O, Hortiguela R, Bullido MJ, Calero M. Apolipoprotein E genotyping method by real time PCR, a fast and cost-effective alternative to the TaqMan and FRET assays. *J Neurosci Methods.* 2009;183(2):238-40.
- Corbo RM, Vilaro T, Ruggeri M, Gemma AT, Scacchi R. Apolipoprotein E genotype and plasma levels in coronary artery disease. A case-control study in the Italian population. *Clin Biochem.* 1999;32(3):217-22.

Corrado L, Ratti A, Gellera C, Buratti E, Castellotti B, Carlomagno Y, et al. High frequency of TARDBP gene mutations in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mutat*. 2009;30(4):688-94.

Crean S, Ward A, Mercaldi CJ, Collins JM, Cook MN, Baker NL, et al. Apolipoprotein E epsilon4 prevalence in Alzheimer's disease patients varies across global populations: a systematic literature review and meta-analysis. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2011;31(1):20-30.

de-Almada BV, de-Almeida LD, Camporez D, de-Moraes MV, Morelato RL, Perrone AM, et al. Protective effect of the APOE-e3 allele in Alzheimer's disease. *Braz J Med Biol Res*. 2012;45(1):8-12.

de-Andrade FM, Larrandaburu M, Callegari-Jacques SM, Gastaldo G, Hutz MH. Association of apolipoprotein E polymorphism with plasma lipids and Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population. *Braz J Med Biol Res*. 2000;33(5):529-37.

DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*. 2011;72(2):245-56.

Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA*. 1997;278(16):1349-56.

Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*. 2005;366(9503):2112-7.

Fiesel FC, Weber SS, Supper J, Zell A, Kahle PJ. TDP-43 regulates global translational yield by splicing of exon junction complex component SKAR. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(6):2668-82.

Fita IG, Enciu AM, Stanoiu BP. New insights on Alzheimer's disease diagnostic. *Rom J Morphol Embryol*. 2011;52(3 Suppl):975-9.

Forlenza OV. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. *Rev Psiquiatr Clín*. 2005;32(3):12.

Galimberti D, Scarpini E. Genetics and biology of Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration. *Int J Clin Exp Med*. 2010;3(2):129-43.

Gallone S, Giordana MT, Scarpini E, Rainero I, Rubino E, Fenoglio P, et al. Absence of TARDBP gene mutations in an Italian series of patients with frontotemporal lobar degeneration. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2009;28(3):239-43.

Graff-Radford NR, Woodruff BK. Frontotemporal dementia. *Semin Neurol*. 2007 Feb;27(1):48-57.

Hallman DM, Boerwinkle E, Saha N, Sandholzer C, Menzel HJ, Csazar A, et al. The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am J Hum Genet.* 1991;49(2):338-49.

Hampel H, Prvulovic D, Teipel S, Jessen F, Luckhaus C, Frolich L, et al. The future of Alzheimer's disease: the next 10 years. *Prog Neurobiol.* 2011;95(4):718-28.

Herrera E, Jr., Caramelli P, Silveira AS, Nitrini R. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2002;16(2):103-8.

Hill JM, Bhattacharjee PS, Neumann DM. Apolipoprotein E alleles can contribute to the pathogenesis of numerous clinical conditions including HSV-1 corneal disease. *Exp Eye Res.* 2007;84(5):801-11.

Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res.* 1990;31(3):545-8.

Hong MG, Reynolds CA, Feldman AL, Kallin M, Lambert JC, Amouyel P, et al. Genome-wide and gene-based association implicates FRMD6 in Alzheimer disease. *Hum Mutat.* 2012;33(3):521-29.

Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, et al. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet.* 2008;40(5):572-4.

Karantzoulis S, Galvin JE. Distinguishing Alzheimer's disease from other major forms of dementia. *Expert Rev Neurother.* 2011;11(11):1579-91.

Kato-Narita EM, Nitrini R, Radanovic M. Assessment of balance in mild and moderate stages of Alzheimer's disease: implications on falls and functional capacity. *Arq Neuropsiquiatr.* 2011;69(2A):202-7.

Khachaturian AS, Corcoran CD, Mayer LS, Zandi PP, Breitner JC. Apolipoprotein E epsilon4 count affects age at onset of Alzheimer disease, but not lifetime susceptibility: The Cache County Study. *Arch Gen Psychiatry.* 2004;61(5):518-24.

Kirby J, Goodall EF, Smith W, Highley JR, Masanzu R, Hartley JA, et al. Broad clinical phenotypes associated with TAR-DNA binding protein (TARDBP) mutations in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurogenetics.* 2010;11(2):217-25.

Kovacs GG, Murrell JR, Horvath S, Haraszti L, Majtenyi K, Molnar MJ, et al. TARDBP variation associated with frontotemporal dementia, supranuclear gaze palsy, and chorea. *Mov Disord.* 2009;24(12):1843-7.

Lillo P, Hodges JR. Frontotemporal dementia and motor neurone disease: overlapping clinic-pathological disorders. *J Clin Neurosci.* 2009;16(9):1131-5.

Liscic RM, Grinberg LT, Zidar J, Gitcho MA, Cairns NJ. ALS and FTLT: two faces of TDP-43 proteinopathy. *Eur J Neurol.* 2008;15(8):772-80.

Lopes MA, Bottino CM. [Prevalence of dementia in several regions of the world: analysis of epidemiologic studies from 1994 to 2000]. *Arq Neuropsiquiatr*. 2002;60(1):61-9.

Lopez OL. The growing burden of Alzheimer's disease. *Am J Manag Care*. 2011;17 Suppl 13:S339-45.

Mackenzie IR, Neumann M, Bigio EH, Cairns NJ, Alafuzoff I, Kril J, et al. Nomenclature for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: consensus recommendations. *Acta Neuropathol*. 2009;117(1):15-8.

Mahley RW, Huang Y. Apolipoprotein (apo) E4 and Alzheimer's disease: unique conformational and biophysical properties of apoE4 can modulate neuropathology. *Acta Neurol Scand Suppl*. 2006;185:8-14.

McKeith I. Dementia with Lewy bodies. *Dialogues Clin Neurosci*. 2004;6(3):333-41.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.

Neary D, Snowden JS, Gustafson L, Passant U, Stuss D, Black S, et al. Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology*. 1998;51(6):1546-54.

Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2006;314(5796):130-3.

Neumann M, Tolnay M, Mackenzie IR. The molecular basis of frontotemporal dementia. *Expert Rev Mol Med*. 2009;11:e23.

Nitrini R, Caramelli P, Herrera E, Jr., Bahia VS, Caixeta LF, Radanovic M, et al. Incidence of dementia in a community-dwelling Brazilian population. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2004;18(4):241-6.

Novelli MM, Nitrini R, Caramelli P. Validation of the Brazilian version of the quality of life scale for patients with Alzheimer's disease and their caregivers (QOL-AD). *Aging Ment Health*. 2010;14(5):624-31.

Ojopi EPB, Bertoni A, B., Neto ED. Apolipoproteína E e a doença de Alzheimer. *Rev Psiquiatr Clín*. 2004;31(1):7.

Pimplikar SW. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(6):1261-8.

Rabinovici GD, Miller BL. Frontotemporal lobar degeneration: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and management. *CNS Drugs*. 2010;24(5):375-98.

Rademakers R, Rovelet-Lecrux A. Recent insights into the molecular genetics of dementia. *Trends Neurosci*. 2009;32(8):451-61.

Rassas AA, Mrabet Khiari H, Hadj Fredj S, Sahnoun S, Batti H, Zakraoui NO, et al. High APOE epsilon 4 allele frequencies associated with Alzheimer disease in a Tunisian population. *Neurol Sci.* 2012;33(1):33-7.

Reitz C. Dyslipidemia and dementia: current epidemiology, genetic evidence, and mechanisms behind the associations. *J Alzheimers Dis.* 2012;30(0):S127-45.

Renton AE, Majounie E, Waite A, Simon-Sanchez J, Rollinson S, Gibbs JR, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron.* 2011;72(2):257-68.

Rohrer JD, Lashley T, Schott JM, Warren JE, Mead S, Isaacs AM, et al. Clinical and neuroanatomical signatures of tissue pathology in frontotemporal lobar degeneration. *Brain.* 2011;134(Pt 9):2565-81.

Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med.* 2004;10 Suppl:S10-7.

Rutherford NJ, Zhang YJ, Baker M, Gass JM, Finch NA, Xu YF, et al. Novel mutations in TARDBP (TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genet.* 2008;4(9):e1000193.

Scazufca M, Cerqueira AT, Menezes PR, Prince M, Vallada HP, Miyazaki MC, et al. [Epidemiological research on dementia in developing countries]. *Rev Saude Publica.* 2002;36(6):773-8.

Scazufca M, Menezes PR, Vallada HP, Crepaldi AL, Pastor-Valero M, Coutinho LM, et al. High prevalence of dementia among older adults from poor socioeconomic backgrounds in Sao Paulo, Brazil. *Int Psychogeriatr.* 2008;20(2):394-405.

Schlesinger D, Grinberg LT, Alba JG, Naslavsky MS, Licinio L, Farfel JM, et al. African ancestry protects against Alzheimer's disease-related neuropathology. *Mol Psychiatry.* 2011.

Souza DR, de Godoy MR, Hotta J, Tajara EH, Brandao AC, Pinheiro Junior S, et al. Association of apolipoprotein E polymorphism in late-onset Alzheimer's disease and vascular dementia in Brazilians. *Braz J Med Biol Res.* 2003;36(7):919-23.

Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 2008;319(5870):1668-72.

Teixeira-Jr ALS, Salgado JV. Demência fronto-temporal: aspectos clínicos e terapêuticos. *Rev Psiquiatr Clín.* 2006;28(1):7.

Valdmanis PN, Daoud H, Dion PA, Rouleau GA. Recent advances in the genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2009;9(3):198-205.

Verpillat P, Camuzat A, Hannequin D, Thomas-Anterion C, Puel M, Belliard S, et al. Apolipoprotein E gene in frontotemporal dementia: an association study and meta-analysis. *Eur J Hum Genet.* 2002;10(7):399-405.

Ward A, Crean S, Mercaldi CJ, Collins JM, Boyd D, Cook MN, et al. Prevalence of apolipoprotein E4 genotype and homozygotes (APOE e4/e4) among patients diagnosed with Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology.* 2012;38(1):1-17.

Wijesekera LC, Leigh PN. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis.* 2009;4:3.

World Health Organization. Dementia: a public health priority. Geneva: WHO; 2012.

Xiong HL, Wang JY, Sun YM, Wu JJ, Chen Y, Qiao K, et al. Association between novel TARDBP mutations and Chinese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Med Genet.* 2010;11:8.

Yener GG, Rosen HJ, Papatriantafyllou J. Frontotemporal degeneration. *Continuum Lifelong Learning Neurol.* 2010;16(2):20.

Zago S, Poletti B, Morelli C, Doretti A, Silani V. Amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia (ALS-FTD). *Arch Ital Biol.* 2011;149(1):39-56.