CAMILA FERNANDES NASCIMENTO

**Caracterização das alterações da proteína TDP-43
durante o envelhecimento normal: uma análise em
cérebros humanos *postmortem***

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

Programa de Fisiopatologia
Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Lea Tenenholz
Grinberg

São Paulo
2015

CAMILA FERNANDES NASCIMENTO

**Caracterização das alterações da proteína TDP-43
durante o envelhecimento normal: uma análise em
cérebros humanos *postmortem***

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

Programa de Fisiopatologia
Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Lea Tenenholz
Grinberg

São Paulo
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Nascimento, Camila Fernandes

Caracterização das alterações da proteína TDP-43 durante o envelhecimento normal : uma análise em cérebros humanos *postmortem* / Camila Fernandes Nascimento. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Lea Tenenholz Grinberg.

Descritores: 1.Proteinopatias TDP-43 2.Cérebro 3.Encéfalo 4.Envelhecimento
5.Humanos 6.Bancos de tecidos 7.Autopsia

USP/FM/DBD-074/15

Dedico esse trabalho,

à minha família, meus pais e minha irmã, que são minha principal fonte de conhecimento. Por mais que não entendessem nada sobre esse mundo científico, sempre acreditaram em mim, me apoiaram e deram forças para que eu pudesse persistir rumo aos meus objetivos.

ao meu esposo, Luiz Rogério Mantelli, que mesmo entendendo o mundo científico também me apoiou incondicionalmente, inclusive nos momentos em que foi necessário ficarmos distantes fisicamente. Assim como sempre conversamos, sei que teria conseguido sem você, mas com você ao meu lado é sempre melhor, é completo.

ao desenvolvimento da ciência e do ser humano. O que me faz acordar todos os dias e seguir em uma certa direção, é acreditar na minha contribuição em algo maior do que eu.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lea Tenenholz Grinberg, por ter acreditado em mim desde o início e me dado a oportunidade de desenvolver esse projeto sob sua orientação. Você abriu as portas do seu laboratório para me receber dando-me a oportunidade de aprender sobre neuropatologia microscópica e macroscópica de casos de Doença Lobar Frontotemporal, além de entrar em contato com técnicas de estereologia. Além disso, você também abriu as portas da sua casa para me receber e tive o enorme prazer de conhecer a sua linda família. Agradeço também pelo importante apoio durante o período em que estive no Canadá. São inúmeras as oportunidades que você me proporcionou. Agradeço por todas as portas abertas!

Ao Prof. Dr. Wilson Jacob-Filho, com quem tive meu primeiro contato muito antes de pensar que um dia faria parte do "GEROLAB". Antes mesmo de iniciar o meu Mestrado, o senhor abriu as portas do seu escritório, ouviu minhas ideias e anseios atentamente, dando-me ótimos conselhos. Confesso que fiquei surpresa com a hospitalidade e disponibilidade e, naquele momento, pensei que não teria a oportunidade de conviver com alguém que tivesse tais características. Ainda bem que eu estava errada. Hoje tenho a oportunidade de conviver um pouco mais com o senhor para discutir ideias, mesmo que por menos tempo do que gostaria. Agradeço muito pela oportunidade da convivência e pelo aprendizado que ela me proporciona.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Gonçalves Pasqualucci, por todo o apoio institucional prestado, imprescindível para a realização desse trabalho. O senhor sempre olha para as pessoas como seres humanos, se importando com situações extra-laboratório que aparecem em suas vidas e comigo não foi diferente. Admiro muito essa característica e sempre quando o procuro, sou convidada a sentar-me e contar a situação com tranquilidade. Como resultado, sempre deixo sua sala com uma resposta e sinto que alguém está olhando por mim. Além disso, o senhor contribuiu também com a minha formação acadêmica, dando-me a oportunidade de participar como monitora do

Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino (PAE) na disciplina de Patologia Geral. Foi uma experiência valiosa acompanhar as suas aulas.

À Profa. Dra. Renata Elaine Paraizo Leite, pela recepção e confiança desde quando iniciei minhas atividades no laboratório. O apoio institucional prestado por você foi imprescindível para o desenvolvimento desse trabalho. Sem falar das sugestões feitas, da companhia, das conversas, dos conselhos (incluindo os fisioterapêuticos) e do sorriso no rosto de todos os dias, que tornam o ambiente de trabalho agradável. Além disso, você sempre se mostrou disponível para me ouvir e procurar entender. Todas as vezes que precisei me ausentar do laboratório para focar nas atividades científicas tive o seu apoio. Sem isso certamente não teria conseguido.

À Profa. Dra. Cláudia Kimie Suemoto, pela valiosa colaboração na etapa de análises estatísticas do trabalho. Sua colaboração foi muito importante não somente para o desenvolvimento do trabalho, mas também para a minha formação. Aprofundei meu conhecimento em bioestatística e aprendi a maneira mais apropriada de apresentar os resultados. Além disso, sua colaboração nas etapas de análises multivariadas e escrita do manuscrito foram essenciais para a finalização e melhoria da qualidade científica do trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Nitrini, pela oportunidade de entrar em contato com o material encefálico dos casos de Demência Frontotemporal cujos pacientes foram acompanhados e diagnosticados em vida. Além da coleta, processamento e análise macroscópica desses casos, também tive a oportunidade de obter casos DLFT-TDP que foram utilizados como controle positivo na etapa de imunoistoquímica do trabalho. Além disso, também foi de grande contribuição para a minha formação assistir suas aulas e ouvir suas sugestões apontadas durante as reuniões científicas.

Ao Prof. Dr. José Marcelo Farfel, por todas as sugestões feitas durante o andamento do projeto, pelo apoio, pela confiança e pela oportunidade e portas que você tem aberto para mim. Agradeço também pela convivência durante as reuniões e conversas que sempre me mostra o lado otimista de tudo.

À Profa. Dra. Renata Eloah de Lucena Ferretti-Rebustini, pela coordenação da equipe de entrevista clínica que foi importante para a coleta das variáveis clínicas e sociodemográficas investigadas nesse trabalho. Agradeço pelo empenho no treinamento da equipe e rigor com que essa atividade é desenvolvida.

Aos familiares participantes do projeto que, mesmo em um momento de dor e luto, se dispuseram a participar, disponibilizando informações sobre seus entes queridos, bem como autorizando a doação do encéfalo dos mesmos. A colaboração desses familiares é de grande contribuição para o avanço do conhecimento no tema envelhecimento e doenças neurodegenerativas associadas e também para o desenvolvimento da pesquisa no país.

Ao grupo do sistema de verificações de óbitos, incluindo diretor, médicos patologistas plantonistas e técnicos, pela paciência e disponibilidade imprescindíveis para a realização do trabalho.

À todos os integrantes que um dia passaram pelo Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral contribuindo para os procedimentos de rotina do laboratório, desde a entrevista clínica, até os procedimentos histológicos. Uma vez que esse projeto utilizou material coletado desde 2004, sem a dedicação de cada uma dessas pessoas, não teria sido possível a realização desse trabalho.

Às companheiras “pós-graduandas” Ana Tereza Di Lorenzo Alho, Kátia Cristina de Oliveira, Edilaine Tampellini, Roberta Diehl Rodriguez, Livia Polichiso, Luzia Lima, Mariana Molina e Maria Dantas Godoi com quem tive oportunidade de conviver nesse período. Agradeço à Ana Tereza, Kátia, Luzia e Mariana pelo empenho no treinamento e orientação das equipes pelas quais cada uma é responsável. A dedicação de vocês sem dúvidas aumenta a qualidade técnica e científica das atividades do laboratório. Agradeço à Ana Tereza e Roberta, pela colaboração na etapa de diagnóstico anatomopatológico dos achados de TDP-43. À Kátia por se dispor a ler minha tese linha por linha, me ajudando na correção e apontando sugestões importantes. À Livia que através do seu jeito emotivo e apaixonado, despertou-me o interesse em arriscar e realizar um tipo

de pesquisa diferente. À Luzia, Mariana e Edilaine, pelo acolhimento desde o início das minhas atividades no laboratório, vocês com muita atenção e paciência, me mostraram as atividades que desenvolvem com rigor. Além disso, vocês se dispuseram a ler a tese, apontando erros e sugestões. Por fim, todas vocês são pessoas incríveis, cada uma com uma característica especial e sem igual que se complementam e me ensinam tantas coisas. Muito obrigada pelo carinho, pelas sugestões, conversas e amizade.

À Keila Maria Silva, pelo acolhimento, paciência e dedicação em meu treinamento no corte dos blocos histológicos desde o início das minhas atividades. Agradeço também pela organização do laboratório, imprescindível para o andamento do projeto. Nas etapas finais do trabalho, você também me auxiliou com a checagem dos blocos e envio de casos para diagnóstico, essa etapa foi essencial para aumentar o n amostral do trabalho, bem como para a sua finalização. Além disso, você sempre colocou palavras que me fizeram refletir e também me deram forças. Obrigada pelo carinho.

À nossa secretária, Marta Crocci, querida “Martinha”, sempre pronta para nos ajudar e alegrando os nossos dias. Sua atenção e carinho tornam o ambiente de trabalho agradável.

À todos os participantes das atividades do GEROLAB com quem tive oportunidade de conviver durante o período do meu Doutorado: Ariane Cristine Moretto, Arthur Feltrin, Camila Alves, Caroline Bazan, Cintia Crizol, Cristina Aranha, Eliza Guccione, Dra. Inês Liguori Padrão, Juliana Oliveira Martins, Kátylla Gusmão, Dra. Márcia Lorena Fagundes Chaves, Márcio Damico, Mônica Díaz, Paloma Muñoz, Peterson Caballero, Rafaela Godoi Sabadin, Ricardo Caires, Tamiris Januário, Tércio Oliveira, Thamiris Prata. Agradeço em especial à Ariane, Camila, Cristina e Kátylla, pelo auxílio com a checagem de casos e separação de lâminas. Ao Ricardo Caires, pela separação das entrevistas clínicas e auxílio com a coleta de dados no SVO. À Dra. Márcia pelas sugestões realizadas durante as reuniões científicas. À Thamiris Prata pela organização e listagem de casos e também pela oportunidade de co-orientação em seu projeto de iniciação científica.

Ao grupo do laboratório de patologia cardiovascular Aline Nishizawa, Daniela Souza Farias, Pérola Branca, Fernanda Marinho Campos, Karen Cristina e Anderson Cuelho chefiado pelos professores Carlos Augusto Pasqualucci e Cláudia Kimie Suemoto, por sempre me receberem de braços abertos quando foi necessária a utilização do espaço físico do laboratório. Agradeço também à Aline e Daniela, pela amizade, pelas conversas, discussões científicas importantes para minha formação. Em especial, agradeço à Daniela pela leitura da tese e sugestões realizadas.

Aos professores, Alexandre Valotta da Silva, Merari de Fátima Ramires Ferrari e Luiz Giorgetti de Britto, pelas relevantes observações e sugestões realizadas durante meu exame de qualificação que contribuíram para a melhoria do trabalho, bem como para a minha formação.

Aos professores Beny Laffer, Trevor L Younge e Ana Andreazza por me receberem em seu laboratório para realizar o Doutorado Sanduíche na Universidade de Toronto durante 6 meses. Durante esse período, tive a oportunidade de trabalhar com cultura de células neuronais, técnicas bioquímicas e de imunofluorescência com foco no papel do estresse oxidativo em distúrbios neuropsiquiátricos.

À pesquisadora e amiga Helena Kim pela dedicação em meu treinamento nas técnicas de ELISA, imunofluorescência e análise por *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) com tecido cerebral humano que faziam parte do seu projeto de Doutorado. Agradeço também por sua colaboração essencial para o andamento e conclusão do projeto que desenvolvi que durante o meu estágio em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Jarbas Arruda Bauer, o senhor vem contribuindo com minha formação acadêmica desde o Mestrado. Aprendi com o senhor da melhor forma possível, a histologia básica e do sistema nervoso. Agradeço também pela amizade e pelos conselhos. Você foi uma das inspirações para que eu seguisse o caminho das “neurocoisas”. Obrigada pela dedicação, pela inspiração e por nos ensinar o verdadeiro sentido da palavra educador.

Às minhas companheiras de graduação, Danielle Varin, Livia Polichiso, Mariana Abrahão e Raquel Schnyder. É um prazer muito grande poder acompanhar cada passo na vida de vocês e também por ter vocês ao meu lado acompanhando os meus passos. É mais incrível ainda perceber que a energia que sinto quando estamos juntas jamais se modifica ao longo do tempo.

Aos meus sogros, Maria Bernadete Vallezi Mantelli e Luiz Carlos Mantelli e meus cunhados, Juliana Mantelli, André Tarifa e Rogério Rodrigues pela paciência e compreensão. A carreira de pesquisa requer esforços diferentes daqueles observados para outras carreiras, devido a isso, o apoio de vocês é muito importante a cada etapa. Agradeço pelas altas horas de conversa e reflexão com o meu cunhado psicólogo Rogério Rodrigues. E também à minha sogra pelos conselhos e por dar-me a oportunidade de conviver com uma cuidadora como ela. A dedicação com que ela presta os cuidados à sua mãe, com doença Alzheimer e acamada há 4 anos, é algo raro de se ver.

Aos funcionários do programa de pós-graduação em Fisiopatologia Experimental pela dedicação e atenção.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo nº: 2011/19833-7) pelo suporte financeiro, incluindo concessão de bolsa de Doutorado e reserva técnica essenciais tanto para a realização desse trabalho como para a minha formação científica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e o Ministério das Relações Exteriores e de Comércio Internacional do Canadá (DFAIT) pela concessão da bolsa de Doutorado-Sanduiche.

*“O segredo não é correr atrás das borboletas...É cuidar do jardim
para que elas venham até você”*

Mário Quintana

RESUMO

Nascimento CF. Caracterização das alterações da proteína TDP-43 durante o envelhecimento normal: uma análise em cérebros humanos *post-mortem* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2015.

INTRODUÇÃO: A proteína TDP-43 (Transactive DNA-binding protein 43) é o principal agregado proteico anormal verificado em casos de Degeneração Lobar Frontotemporal (DLFT) e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). Apesar dos avanços na área, o papel da TDP-43 no envelhecimento normal ainda é pouco compreendido. A falta de indivíduos controles em estudos de associação clinicopatológica com tecido cerebral humano é resultado do alto custo da prática de autópsia mundialmente. O que é um diferencial do Brasil, onde essa prática é obrigatória em casos de morte natural sem causa definida. O Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral (BEHGEEC) possui grande número de encéfalos de sujeitos sem déficit cognitivo com alta miscigenação étnica e variação de graus de escolaridade. O que possibilita estudos mais aprofundados sobre envelhecimento cerebral humano não-patológico. **OBJETIVOS:** (1) investigar de maneira sistemática a distribuição dos achados neuropatológicos da TDP-43 no envelhecimento humano normal; (2) caracterizar a distribuição dessa proteína em diferentes áreas encefálicas; (3) explorar associação de características, clínicas, sociodemográficas ou neuropatológicas com o aparecimento das inclusões de TDP-43. **MÉTODOS:** Foram incluídos participantes com idade acima de 50 anos e classificados clinicamente e anatomopatologicamente como normais. Reação imunoistoquímica contra a conformação anormal da TDP-43 foi realizada em três regiões cerebrais de interesse córtex temporal, amígdala e hipocampo. **RESULTADOS:** Os agregados de TDP-43 estavam presentes em 10,5% dos indivíduos estudados (n=323). A região mais frequentemente acometida foi a amígdala (85,3% dos casos). O acúmulo de TDP-43 foi associado à idade e raça (p=0,002). Análise de regressão logística demonstrou que indivíduos da raça asiática possuem maior chance de apresentar os agregados de TDP-43 do que caucasianos, independente dos fatores gênero, idade, estágio de Braak para emaranhados neurofibrilares e escolaridade (*odds ratio*=3,5; intervalo de confiança: 1,41-8,69, p=0,007). **CONCLUSÕES:** Os resultados sugerem que o acúmulo anormal de TDP-43 aumenta com o avanço da idade e que a amígdala é a região cerebral mais susceptível ao acúmulo desse tipo de inclusão. Como os idosos estudados são cognitivamente normais, sugerimos que indivíduos asiáticos estão protegidos contra os efeitos deletérios da proteína TDP-43 no cérebro. Futuros estudos de associação clinicopatológica e genética em populações de diferentes raças poderão contribuir para identificação de possíveis fatores de proteção contra a expressão clínica dos achados da proteína TDP-43.

Descritores: Proteinopatias TDP-43. Cérebro. Encéfalo. Envelhecimento. Humanos. Bancos de tecidos. Autopsia.

ABSTRACT

Nascimento CF. Characterization of TDP-43 changes during normal aging: a human brain *post-mortem* study [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2015.

BACKGROUND: Transactive DNA-binding protein 43 (TDP-43) is the major abnormal aggregate present in Frontotemporal Lobar Degeneration (FTLD) and Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). Although all the efforts in research in this field, the role played by TDP-43 in normal aging is still unknown. The lack of normal controls in studies focusing on clinicopathological associations is a result of the high cost of autopsy practice worldwide. In Brazil, autopsy is mandatory by law in cases without a certificate. The Brain Bank of the Brazilian Aging Study Group (BBBASG) comprises a large number of cognitively normal elderly subjects highly ethnically admixed and with broad education attainment. This allow us to further study the non-pathological process of the human aging brain. **GOALS:** (1) systematically investigate the distribution of neuropathological findings of TDP-43 in the normal human brain; (2) characterize the distribution of these findings in different brain regions; (3) explore clinical, sociodemographics or neuropathological variables that could be associated with TDP-43 inclusion outcome. **METHODS:** We included participants over 50 years old previously classified cognitively and neuropathologically as normals. Immunohistochemistry against abnormal form of TDP-43 was performed in three brain regions: temporal cortex, hippocampal formation and amygdala. **RESULTS:** TDP-43 aggregates were present in 10,5% of the study subjects (n=323). Amygdala was the most frequently affected brain region (85.3% of the cases). TDP-43 accumulation was associated with age at death and race ($p=0.002$). Logistic regression analysis showed that asians older adults have higher odds of presenting TDP-43 inclusions than caucasians, regardless of gender, age, Braak stage for neurofibrillary tangles and education attainment (OR=3.5, CI: 1.41-8.69, $p=0.007$). **CONCLUSIONS:** Our results suggest that TDP-43 abnormal accumulation increases along aging process and the amygdala is the brain region most susceptible to these alterations. Because we studied cognitively normal elderly, we suggest that Asians older adults are protected against deleterious effects of TDP-43 in the brain. Future clinicopathological and genetic studies in populations dwelling in different ethnical backgrounds may identify possible protecting factors against the clinical expression of TDP-43 neuropathological findings.

Descriptors: Proteinopathies TDP-43. Cerebrum. Encephalo. Aging. Humans. Tissue banks. Autopsy

TABELAS

Tabela 1 - <i>Escalas utilizadas rotineiramente pelo BEHGEEC para avaliação de domínios cognitivos e obtenção de informações sócioeconômicas.</i>	58
Tabela 2 - <i>Regiões amostradas rotineiramente segundo o protocolo do BEHGEEC para criopreservação e exame anatomopatológico.</i>	60
Tabela 3 - <i>Áreas imunocoradas e anticorpos rotineiramente utilizados no BEHGEEC</i>	62
Tabela 4 - <i>Número de casos por grupo, número de casos já caracterizados e número de casos disponíveis no início do projeto para sorteio de acordo com gênero e faixa etária, para a caracterização de inclusões da proteína TDP-43.</i>	63
Tabela 5 - <i>Tabela referente ao número e porcentagem de casos desejados e analisados de acordo com gênero e faixa etária.</i>	70
Tabela 6 - <i>Características dos indivíduos TDP-43 positivos e negativos (n=323).</i> 72	
Tabela 7 - <i>Associação entre TDP-43 e raça (n=323).</i>	73
Tabela 8 - <i>Áreas encefálicas afetadas pelas inclusões anormais de TDP-43 em cada caso positivo (n=34).</i>	82

FIGURAS

Figura 1 - <i>Envelhecimento populacional no mundo, em regiões desenvolvidas e em regiões em desenvolvimento.</i>	23
Figura 2 - <i>Mudança na pirâmide etária da população brasileira.</i>	26
Figura 3 - <i>Padrões de marcação da proteína TDP-43 utilizando-se anticorpos contra diferentes epítomos da proteína (normal e hiperfosforilada)</i>	42
Figura 4 - <i>Diferentes tipos de inclusões da proteína TDP-43 em casos de DLFT-TDP</i>	43
Figura 5 - <i>Subtipos neuropatológicos de DLFT-TDP.</i>	45
Figura 6 - <i>Estrutura primária da proteína TDP-43.</i>	48
Figura 7 - <i>Caso DLFT-TDP utilizado como controle positivo em todas as reações imunohistoquímicas realizadas nesse estudo.</i>	66
Figura 8 - <i>Local de origem dos idosos asiáticos estudados.</i>	74
Figura 9 - <i>Distribuição dos achados de TDP-43 por faixa etária (n=323).</i>	76
Figura 10 - <i>Regiões mais frequentemente afetadas pelo acúmulo de TDP-43 nos indivíduos cognitivamente normais estudados.</i>	78
Figura 11 - <i>Inclusões de TDP-43 no giro frontal superior, no giro do cíngulo e no colículo inferior.</i>	79
Figura 12 - <i>Tipos de inclusão de TDP-43 encontradas nos indivíduos cognitivamente normais estudados.</i>	80
Figura 13 - <i>Inclusões de TDP-43 em regiões próximo à meninge pia-máter e na parede de vasos.</i>	81

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIMs – *Ancestry Informative Markers* (marcadores informativos de ancestralidade)

ANG – gene que codifica a proteína angiogenina

ANOVA – Análise de variância

ATXN2 – gene que codifica a proteína ataxina 2

BEHGEEC-FMUSP – Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

CDR – *Clinical Dementia Rating* (Escore Clínico de Demência)

CERAD - *Consortium to Establish a Register for Alzheimer's disease* (Consórcio para estabelecer registro para Doença de Alzheimer)

C9orf72 – *chromosome open reading frame 72* (preoteína codificada pelo gene C9orf72)

DA – Doença de Alzheimer

DFLT – Degeneração Lobar Frontotemporal

DGA – Doença por Grãos Argirofílicos

DP – Doença de Parkinson

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

DNDs – Doenças Neurodegenerativas

DSM-IV – *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*

DV – Demência vascular

ENF – Emaranhado neurofibrilar

ELA – Esclerose Lateral Amiotrófica

FOXO – *Forhead box O* (proteínas codificadas pelos genes FOXO)

FUS – Fused in sarcoma (proteína de ligação ao DNA codificada pelo gene FUS)

HIV-1 – *Human Immunodeficiency Virus - type 1* (vírus da Imunodeficiência humana tipo 1)

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICN – Inclusão intracitoplasmáticas neuronais

ICG – Inclusão intracitoplasmáticas glial

IGF-1 – *insulin like 1 factor* (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1)

INN – Inclusão intranuclear

IPS – *Induced pluripotent stem cells*

IQCODE – *Informant Questionarie Cognitive Decline in the Elderly*

JNM – junção neuromuscular

MAP1B – *Microtubule associated protein 1B* (proteína associada a microtúbulo do tipo 1B)

ND – Neurito distrófico

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPN – gene que codifica a proteína optineurina

PEC – Projeto Envelhecimento Cerebral
PGRN – *Progranulin* (gene que codifica a proteína progranulina)
RNA – *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)
RNAm – RNA mensageiro
RRM – *RNA recognition motif* (domínio de reconhecimento de RNA)
SNC – Sistema Nervoso Central
SVOC – Serviço de Verificação de Óbitos da Capital
TARDBP – *Tar binding DNA protein* (gene que codifica proteína TDP-43)
TDP-43 – *Tar binding DNA protein 43 kDa* (proteína *tar* de ligação ao DNA que possui 43 kDa)
TOR – *target of rapamycin* (fator de crescimento celular)
UBQLN2 – gene que codifica a proteína ubiquitina tipo 2
VCP – *vasolin containing protein*
VENs – von Economo *neurons* (neurônios de von Economo)

LISTA DE SÍMBOLOS

kDA - kilo dalton

μm – micrômetro

g – gramas

cm – centímetro

mL – mililitro

pH – potencial hidrogeniônico

$^{\circ}\text{C}$ – graus Celcius

NORMALIZAÇÃO BASEADA

Essa tese está baseada de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento dessa publicação:

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 Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suley Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Envelhecimento populacional no mundo e no Brasil	22
1.2. O processo de envelhecimento	27
1.3. Doenças neurodegenerativas e demências	32
1.4. Degeneração Lobar Frontotemporal (DLFT)	36
1.4.1. <i>Manifestações clínicas das DLFTs</i>	37
1.4.2. <i>Tipos neuropatológicos das DLFTs</i>	39
1.4.3. <i>DLFT-TDP</i>	40
1.5. A proteína TDP-43: estrutura e função fisiológicas	47
1.6. A proteína TDP-43 e o processo de neurodegeneração	51
1.7. TDP-43 no envelhecimento normal	52
2. OBJETIVO GERAL	54
2.1. Objetivos Específicos	54
3. METODOLOGIA	55
3.1. Contribuição do Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral (BEHGEEC) para a realização do estudo e de pesquisas científicas na área	55
3.2. Métodos retrospectivos	56
3.2.1. <i>Critérios de seleção</i>	56
3.2.2. <i>Avaliação clínica e funcional</i>	57
3.2.3. <i>Processamento encefálico</i>	58
3.2.4. <i>Exame anatomopatológico</i>	60
3.3. Métodos prospectivos	62
3.3.1. <i>Seleção dos casos</i>	62
3.3.2. <i>Regiões encefálicas de interesse</i>	63
3.3.3. <i>Caracterização do caso controle positivo e padronização do protocolo de imunohistoquímica para a proteína TDP-43 hiperfosforilada</i>	64
3.3.4. <i>Diagnóstico neuropatológico da proteína TDP-43 nos indivíduos estudados</i>	67
3.3.5. <i>Análise das demais áreas encefálicas de interesse</i>	68
3.3.6. <i>Análise de associação de TDP-43 fosforilada e características clínicas, sociodemográficas e neuropatológicas</i>	68
3.3.7. <i>Análises estatísticas</i>	68
4. RESULTADOS	70
4.1. Casos estudados	70
4.2. Análise descritiva	71
4.3. Características sociodemográficas, clínicas e neuropatológicas dos indivíduos TDP-43 positivos: análises univariadas	71
4.4. Análise de níveis de escolaridade entre raças	72

4.5. Investigação da associação de TDP-43 e raça e estágios de Braak: análises multivariadas	73
4.6. Local de origem dos indivíduos asiáticos	73
4.7. Distribuição de inclusões de TDP-43 em faixas etárias pré-senis e senis 75	
4.8. Características neuropatológicas das alterações de TDP-43 na amostra estudada.....	77
5. DISCUSSÃO.....	83
5.1. Alta prevalência do acúmulo anormal de TDP-43 na raça asiática	83
5.2. Associação entre inclusões de TDP-43 e idade	89
5.3. Características neuropatológicas dos achados de TDP-43 na amostra estudada.....	92
5.4. Limitações do estudo	95
6. CONCLUSÕES.....	97
Anexo 1.....	123
Anexo 2.....	124
Anexo 3.....	126

1. INTRODUÇÃO

1.1. Envelhecimento populacional no mundo e no Brasil

O envelhecimento populacional é um proeminente fenômeno mundial. Isso pode ser observado pela evidente mudança na expectativa de vida que ocorreu na última metade do século XX, e está acontecendo no início do século XXI. Essa é uma significativa transição epidemiológica que poderá ser lembrada no futuro, como a maior de todos os tempos (Crews, 2007).

Pode-se refletir sobre a questão da magnitude e velocidade do envelhecimento da população mundial, a partir da seguinte frase retirada do Relatório realizado pela Divisão Populacional da Organização das Nações Unidas (ONU) intitulado “*World Population Ageing: 1950-2050*”:

“O número de indivíduos idosos tem triplicado nos últimos 50 anos e irá triplicar novamente nos próximos 50 anos.”

Os dados retirados desse relatório demonstram que em 1950 existiam 205 milhões de indivíduos com idade igual ou maior que 60 anos em todo o mundo. Apenas três países possuíam mais do que 10 milhões de indivíduos idosos, dentre eles, China (42 milhões), Índia (20 milhões) e Estados Unidos (20 milhões). Após 50 anos, o número de indivíduos idosos nesses países aumentou para 606 milhões. Projeções indicam um aumento de três vezes na população idosa global na primeira metade desse século, chegando em 2 bilhões de indivíduos idosos em 2050 (Figura 1).

Figura 1 - *Envelhecimento populacional no mundo, em regiões desenvolvidas e em regiões em desenvolvimento. Adaptado de (ONU, 2002).*

Dessa maneira, em 2050, estima-se que 33 países possuirão mais de 10 milhões de indivíduos idosos, incluindo 5 países com mais de 50 milhões, China (437 milhões), Índia (324 milhões), Estados Unidos da América (1017 milhões) Indonésia (70 milhões) e Brasil (58 milhões) (ONU, 2002).

Pode-se notar então que o fenômeno de envelhecimento populacional ocorreu inicialmente em países desenvolvidos. No entanto, mais recentemente, é nos países em desenvolvimento que o envelhecimento da população tem ocorrido de maneira mais acentuada.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2005), em países em desenvolvimento, para fins de levantamentos demográficos, denomina-se idoso o indivíduo com idade a partir dos 60 anos e para países desenvolvidos aumenta-se para 65 anos.

O Brasil está entre os países que envelhece de maneira acelerada. O censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010) mostra que a quantidade de idosos no país cresceu 55% entre os anos de 2001 e 2011. Sendo assim, a terceira idade passou de 15,5 para 23,5 milhões de pessoas em 10 anos, passando a representar cerca de 12% da população total do Brasil. Espera-se que o número de idosos no Brasil atinja aproximadamente 30,9 milhões no ano de 2020 (Beltrão et al., 2004). Assim, ocuparíamos o sexto lugar no número de idosos na classificação mundial (Inouye et al., 2008).

Já ao compararmos o crescimento da população idosa em relação ao crescimento da população total em um intervalo de tempo de 25 anos, observamos que o crescimento da população idosa foi de 126,3%, ao passo que o crescimento da população total foi de apenas 55,3%. É verificado então um crescimento mais acelerado da população idosa com relação aos demais grupos etários (Camarano, 1999; Nasri, 2008). Essa alta taxa de crescimento fez com que, na virada do século, a população brasileira de idosos apresentasse um crescimento 8 vezes maior quando comparada às taxas de crescimento da população jovem (Camarano, 1999). Caso essa dinâmica seja mantida, a partir de 2030, o total de idosos ultrapassará o número de jovens entre 15 e 29 anos (IPEA, 2010). A faixa etária de 80 anos cresceu em ritmo

relativamente maior do que a população idosa total, apresentando um crescimento de 246% (Inouye et al., 2008). Atualmente, a faixa etária de 80 anos é a mais numerosa, sendo constituída por 2.935.585 pessoas (IBGE, 2011), representando 14% da população idosa brasileira.

O reflexo dessas mudanças sociais altera a pirâmide etária demográfica do Brasil, cujo cume se amplia enquanto a base se estreita, indicando proporcionalmente mais idosos e menos crianças e jovens na população. Isso torna-se ainda mais evidente quando comparamos a pirâmide etária do último censo do IBGE, realizado em 1991, à pirâmide etária projetada para 2060, como mostra a figura 2 (IBGE, 2012).

Figura 2 - *Mudança na pirâmide etária da população brasileira.* Pirâmide etária absoluta do Brasil segundo o censo do IBGE de 1991 (A), e projeção da pirâmide etária para 2060 (B). Adaptado de (IBGE, 2012).

No Brasil, o fenômeno do envelhecimento populacional ocorre devido ao declínio das taxas de fecundidade e mortalidade, principalmente por conta da melhoria nas condições de vida em geral como, avanços tecnológicos da medicina e maior acesso aos serviços de saúde (Chaimowicz, 1997; Ramos et al., 1987). Acredita-se que a redução da fecundidade no Brasil é a contribuição primária para o fenômeno. Em um quarto de século, foi observado um rápido declínio da fecundidade no país, chegando a 60%. Enquanto que a maior dos países europeus levou quase um século para completar sua transição de fecundidade (Wong e Carvalho, 2006).

Outro fator que contribui para o fenômeno do envelhecimento populacional é o aumento da expectativa de vida. A expectativa de vida é definida pela média estatística do número total de anos de vida esperado para um ser humano em determinado local e em determinadas condições. Diferentemente da longevidade, que é considerada o máximo de anos de vida que um ser humano é capaz de alcançar (Tosato et al., 2007). Enquanto a longevidade de 125 anos para a espécie humana tem permanecido constante ao longo de aproximadamente 100.000 anos, a expectativa de vida tem aumentado. No século XIX, a expectativa de vida ao nascer era de aproximadamente 27 anos (Hayflick, 2000a). Atualmente, dados mostram que a média da expectativa de vida mundial ao nascer é de 71 anos (ONU, 2013). O aumento da expectativa de vida também está associado aos avanços da medicina, como adoção de antibióticos e vacinas, à eliminação de doenças infecciosas que ocorrem durante a juventude, bem como à melhorias de saneamento básico (Tosato et al., 2007).

1.2. O processo de envelhecimento

O envelhecimento é um processo comum a todos os animais, mas ainda existem muitos pontos a serem esclarecidos quanto à dinâmica e à natureza desse processo (Papaléo-Netto, 2006). Dentre as diferentes definições, aquela postulada por Comfort (1979), com relação à biologia do envelhecimento, ainda permanece uma das mais aceitas. Para ele, o processo de envelhecimento pode ser caracterizado por uma redução progressiva da capacidade de manutenção da homeostase do organismo em condições de sobrecarga

funcional. Dessa forma, o processo de envelhecimento em si, não corresponde a um processo patológico, mas sim a um processo que é acompanhado por uma tênue divisão entre a fisiologia e a fisiopatologia do envelhecimento. Assim, o envelhecimento natural ou senescência, é considerado um conjunto de modificações orgânicas, funcionais e psicológicas próprias do envelhecimento. Esse processo implica em perda progressiva da capacidade de adaptação do organismo frente às condições de sobrecarga, no entanto, não acarretando prejuízos à autonomia do indivíduo. Enquanto que, o envelhecimento patológico ou senilidade, é um conjunto de alterações decorrentes de doenças, que podem acompanhar o indivíduo ao longo do envelhecimento (Comfort, 1979). A perda da capacidade de manutenção da homeostase somada à sobrecarga resultante do processo de doença, leva ao surgimento de sintomas de doenças e determina prejuízo à autonomia e independência do indivíduo.

Ao longo dos últimos anos, pesquisas científicas têm se dedicado ao estudo das diversas teorias que pudessem explicar a causa, bem como o processo fisiológico do envelhecimento. Esses estudos levaram ao que são consideradas atualmente, as teorias modernas do envelhecimento. Apesar de existirem controversas, autores consideram o agrupamento dessas teorias em duas categorias principais: a teoria do envelhecimento programado e a teoria dos danos estruturais (Holliday, 2006; Jin, 2010). A primeira categoria postula que o envelhecimento seria um processo programado no qual as células já teriam uma data programada para o seu último dia de funcionamento. A segunda consiste na ideia do dano devido ao uso, ou seja, as células possuem um maquinário que acaba sendo danificado devido ao uso prolongado. Abaixo estão descritas, de maneira sucinta, as subdivisões de cada uma dessas categorias. A teoria do envelhecimento programado se divide em 3 subcategorias:

- 1) Teoria da longevidade programada: nesse caso o envelhecimento resulta de uma mudança sequencial em certos genes programados para ligar e desligar ao longo do tempo, dessa forma, a senescência é definida como o tempo no qual os déficits associados à idade são manifestados. Esses déficits

teriam como causa a instabilidade genética associada à dinâmica do envelhecimento (Davidovic et al., 2010). Um exemplo clássico para explicar essa teoria, é o limite de Hayflick, que descobriu o processo de senescência em modelos *in vitro* e *in vivo*. Através desses estudos, ele propôs que o comprimento do DNA telomérico, localizado nas extremidades dos cromossomos, consiste em sequências repetitivas de DNA, que tem um papel protetor e diminui a cada divisão nas células somáticas. Além disso, a perda dessas sequências teloméricas ocasionam o envelhecimento precoce, ao passo que a enzima telomerase, que repõe essas sequências, teria o papel de manter constante o comprimento dos telômeros, e resultaria na imortalidade;

- 2) Teoria endócrina: nessa teoria, o relógio biológico age através de hormônios que controlam os passos do envelhecimento. Estudos recentes confirmam que o envelhecimento é hormonalmente regulado e que a via de sinalização do sistema fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1) é evolutivamente conservado e tem papel fundamental na regulação hormonal do envelhecimento (van Heemst et al., 2005);
- 3) Teoria imunológica: o sistema imune é programado para o declínio ao longo do tempo, o que leva ao aumento da vulnerabilidade à doenças infecciosas, envelhecimento e morte. Já é bem conhecido que a eficácia do sistema imune tem picos durante a puberdade e apresenta um declínio gradual com o avanço da idade. Por exemplo, durante o processo de envelhecimento, os anticorpos perdem sua eficácia e uma quantidade inferior de novas doenças pode ser combatida de maneira efetiva pelo organismo, fato esse que causa estresse e eventual morte celular (Cornelius, 1972). De maneira importante, desregulação da resposta do sistema imune tem sido atribuída ao desenvolvimento de doenças

cardiovasculares, Doença de Alzheimer (DA) e câncer (Rozemuller et al., 2005).

Já a teoria do envelhecimento por danos ou erros inclui as seguintes subdivisões:

- 1) Teoria do *wear and tear*: que em português pode ser traduzida como desgaste devido ao uso, nesse caso, células e tecidos possuem partes vitais que quando danificadas, resultam no envelhecimento. Assim como componentes de um carro antigo, partes do corpo são eventualmente danificadas por uso repetido, impedindo então seu funcionamento, bem como o do organismo como um todo. Essa teoria do envelhecimento foi introduzida em 1882 por August Weismann, e até hoje é amplamente utilizada devido a facilidade de entendimento à analogia utilizada.
- 2) Teoria da taxa de vida: quanto maior a taxa basal de consumo de oxigênio, menor o tempo de vida do organismo (Brys et al., 2007). Embora essa teoria do envelhecimento seja aplicável, não é completamente adequada para explicar o tempo máximo de longevidade (Hulbert et al., 2007). Existem linhas de evidências que propõem que outros fatores, além da taxa de consumo de oxigênio, seriam determinantes da taxa de vida, como fatores de transcrição FOXO, que são proteínas importantes da via da insulina e TOR, um fator central do controle do crescimento celular (Rollo, 2010).
- 3) Teoria do dano cruzado: a teoria do dano cruzado ou do *cross-linking* foi proposta por Johan Bjorksten in 1942 (Bjorksten e Tenhu, 1990). De acordo com essa teoria, um acúmulo de proteínas com danos cruzados causa lesões a células e tecidos, diminuindo o processo de funcionamento dos organismos resultando no envelhecimento. Essas ligações cruzadas podem ser causadas por elevado nível de glicemia e glicose tecidual (Hayoz et al., 1998). Estudos já demonstraram que reações cruzadas de proteínas estão envolvidas em

mudanças relacionadas ao processo de envelhecimento (Bjorksten e Tenhu, 1990).

- 4) Teoria do dano ao DNA: danos ao DNA somático e mitocondrial ocorrem continuamente em células de organismos vivos. Esses danos ocorrem quando a DNA polimerase e os outros mecanismos de reparo ao DNA não são capazes de superar os danos causados pelo metabolismo, por exemplo, o dano oxidativo (Sohal e Allen, 1985). Mutações genéticas ocorrem e acumulam-se com o aumento da idade causando malfuncionamento e deteriorização das células
- 5) Teoria dos radicais livres: Essa teoria introduzida por Gerschman em 1954 e posteriormente aprimorada por Denham Harman (Gerschman et al., 1954; Harman, 1956) propõe que o superóxido e outros radicais livres causam danos aos componentes macromoleculares das células, ocasionando então danos cumulativos às células e eventualmente aos órgãos, levando à consequente parada de seu funcionamento. Os radicais livres são átomos ou moléculas altamente reativos, que contêm um número ímpar de elétrons em sua última camada, conferindo alta reatividade a esses elementos (Halliwell e Gutteridge, 1990; Halliwell et al., 1992). Esses elementos podem reagir com ácidos nucleicos, lipídeos, açúcares e proteínas. O organismo possui antioxidantes naturais em forma de enzimas, que ajudam a conter os danos causados pelos radicais livres. Existem também experimentos que mostram que as vias de sinalização de espécies reativas de oxigênio, enzimáticas ou genéticas, são importantes para o desenvolvimento da senescência celular e do envelhecimento do organismo (Afanas'ev, 2011).

Essas teorias do envelhecimento são de grande importância para o entendimento das mudanças fisiológicas que ocorrem com o aumento da idade (Jin, 2010). No entanto, uma visão global desses tópicos é necessária para entender de maneira mais aprofundada os aspectos do envelhecimento

(Holliday, 2006). A procura por um único fator relacionado ao envelhecimento (como um único gene, por exemplo) tem sido substituída por uma visão multifatorial do processo (Kowald e Kirkwood, 1996; Weinert e Timiras, 2003). Assim, as diferentes teorias do envelhecimento não devem ser consideradas mutuamente exclusivas e sim complementares de maneira a explicar todas as características do envelhecimento normal (Weinert e Timiras, 2003).

A partir dos processos descritos nessas teorias observa-se que a linha de divisão entre senescência e senilidade é tênue. Dessa forma, uma atenção especial deve ser dada à questão fundamental sobre porque as células mais velhas são mais vulneráveis ao desenvolvimento de doenças do que células mais jovens. Essa questão não somente promove avanços importantes no conhecimento da senescência, como também auxilia no entendimento de doenças relacionadas ao envelhecimento (Hayflick, 2000b).

1.3. Doenças neurodegenerativas e demências

O aumento da população idosa faz com que ocorra também o aumento na incidência das enfermidades relacionadas ao envelhecimento (Baer et al., 2000; Kalache et al., 1987). Dentre as enfermidades cujo fator de risco é o envelhecimento, as Doenças Neurodegenerativas (DNDs) são as mais prevalentes e incapacitantes (WHO, 2002). As DNDs compartilham características clínicas, patológicas e moleculares (Tanzi e Bertram, 2005).

Patologicamente, o processo de neurodegeneração, , pode ser restrito à tipos específicos de células e tecidos do Sistema Nervoso Central (SNC), em fases iniciais da doença. Por exemplo, o classicamente conhecido acometimento de neurônios dopaminérgicos da substância negra na Doença de Parkinson (DP (Braak et al., 2003; Damier et al., 1999; Gibb e Lees, 1991) e de neurônios do hipocampo na Doença de Alzheimer (DA (Braak e Braak, 1991). Em estágios avançados, é verificado também um acometimento em outras regiões do SNC, levando inclusive a alterações macroscópicas como as atrofia (Pirttila et al., 1993). Além dessas alterações, é também observada perda neuronal (Kanazawa, 2001), que por sua vez pode ser acompanhada por inflamação e ativação do sistema imune (Blach-Olszewska e Leszek, 2007; Cappellano et al., 2013).

Histopatologicamente, DNDs são caracterizadas pelo depósito de proteínas malformadas, agregados proteicos (Soto e Estrada, 2008) e perda neuronal. O acúmulo intracelular e extracelular de proteínas anormais em regiões cerebrais específicas é uma característica patológica marcante das DNDs. Acredita-se que esse fator é o que pode levar a neurotoxicidade, neurodegeneração e finalmente à manifestação clínica (Ross e Poirier, 2004; Soto, 2003). Já foi verificado que as DNDs se desenvolvem de maneira silenciosa por muitos anos antes do aparecimento dos sintomas clínicos (Beach et al., 2012). Esse estudo de correlação clinicopatológica demonstrou que no momento em que as primeiras manifestações de déficit cognitivo observadas na DA ocorrem, grande porcentagem de neurônios já está irreversivelmente comprometida. As inclusões intracelulares verificadas em pacientes com DNDs são geralmente positivas para ubiquitina e adquirem conformação amiloidogênica contendo estruturas β -pregueadas (Ross e Poirier, 2004; Soto, 2003). Esse tipo de conformação expõe regiões hidrofóbicas da molécula que normalmente estão escondidas em sua conformação nativa. A exposição de estruturas hidrofóbicas, promove oligomerização e agregação anormal da proteína (Bolognesi et al., 2010; Chiti e Dobson, 2006; Kaye et al., 2003; Soto, 2003). Tem sido sugerido que mutações genéticas, fatores ambientais e diferentes condições de estresse, induziriam ao acúmulo anormal dessas proteínas em casos de doença o que implicaria em mecanismos patogênicos similares por trás de sua fisiopatologia (Voisine et al., 2010). Apesar de algumas características serem consideradas patognomônicas para determinados fenótipos clínicos, como os depósitos intracelulares da proteína tau hiperfosforilada (formando os emaranhados neurofibrilares - ENF) e depósitos extracelulares da proteína β -amilóide (formando as placas neuríticas) na DA (Duyckaerts et al., 2009) e os depósitos da proteína α -sinucleína na DP (Jellinger, 2002). Tem sido reconhecido que as mesmas entidades clínicas podem demonstrar graus consideráveis de heterogeneidade histopatológica, como é o caso da Degeneração Lobar Frontotemporal (DLFT) que está associada ao acúmulo de diferentes tipos de proteínas (tau, TDP-43, FUS e ubiquitina (Mackenzie et al., 2009). Da mesma forma que, características histopatológicas também podem ser compartilhadas

por diferentes entidades clínicas, como é o caso da tau hiperfosforilada presente em casos de DA e DLFT, e da TDP-43 em DLFT e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA).

As DNDs podem apresentar histórico familiar de doença sugerindo uma contribuição de fatores genéticos no que diz respeito a sua causa e progressão. Já foi verificado que DA, DP, DLFT e ELA apresentam formas de doença mais raras consideradas familiares (seguindo padrão de herança mendeliana). Em contrapartida, os casos mais comuns são os considerados formas de doença aparentemente não familiar, não seguindo a herança mendeliana (Tanzi e Bertram, 2005). Esse último tipo, é também denominado esporádico, e pode ser causado por mutações não mendelianas ou por outros fatores ainda desconhecidos. Assim como verificado para as características clínicas e patológicas, diferentes tipos clínicos de DNDs podem compartilhar mutações nos mesmos genes, como é o caso da DLFT e ELA que apresentam mutações nos genes, VCP, que expressa a proteína vasopressina, e C9orf72, que codifica uma proteína cuja função não é conhecida (Dejesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011).

Clinicamente, as DNDs apresentam manifestações clínicas diversas que estão relacionadas às áreas encefálicas afetadas durante o curso da doença. As manifestações clínicas caracterizam-se por um início insidioso em fases mais tardias da vida adulta, declinando gradualmente. Classicamente, essas doenças são conhecidas por afetarem primariamente domínios cognitivos (como memória, habilidades visoespaciais, linguagem, funções executivas) caracterizando quadros demenciais (Gmitrowicz e Kucharska, 1994). Estágios avançados levam à incapacidades físicas graves. Evidências crescentes mostram também alterações emocionais e comportamentais (Johnstone et al., 2002; Libon et al., 2001; Neary et al., 1998). Os sintomas clínicos se sobrepõem e um mesmo fenótipo pode ser verificado em mais de um tipo de doença neurodegenerativa, como, por exemplo, características da DA e da DLFT que podem também ser acompanhadas por sintomas motores verificados na DP e na ELA.

As DNDs são as principais causas de demência e incapacidade na

população idosa (Burns e Iliffe, 2009). As demências já são consideradas a principal causa de incapacidade na população idosa. Estimativas realizadas em 2010 mostraram que 35,6 milhões de pessoas com 60 anos de idade têm demência em todo o mundo, indicando uma prevalência mundial de 4,7% (OMS, 2002). Isso significa que, a cada ano, 7 milhões de indivíduos são diagnosticados com demência, ou seja, o surgimento de 1 novo caso a cada 4 segundos. Estimativas da OMS mostram que o número de pessoas diagnosticadas com demência dobrará a cada 20 anos, totalizando 65,7 milhões em 2030 e 115,4 milhões em 2050.

Revisões sobre prevalência de demência em países desenvolvidos encontraram índices de 4,2% no Canadá e 14,5% na Espanha, e 5,5% e 9% no Japão e Estados Unidos (Kalaria et al., 2008; Lobo et al., 2000; Lopes e Bottino, 2002; Lopes et al., 2007). Na América Latina estudos mostraram uma prevalência de 7,1% (Mangone e Arizaga, 1999; Nitrini et al., 2009). No Brasil, um estudo recente obteve os mesmos resultados prevalência de demência observados na América Latina como um todo (7,1%) (Herrera et al., 2002). Dentre os tipos de demência verificadas no Brasil, a DA foi a mais frequente observada em 55,1% dos casos. Os estudos sobre prevalência de Demência Frontotemporal no Brasil foram realizados com dados ambulatoriais apenas. Um desses estudos mostrou uma prevalência relativamente baixa de DFT (2,6%). Outro estudo que incluiu indivíduos em faixas etárias pré-senis, verificou uma prevalência de 5% (Fujihara et al., 2004).

Apesar da perspectiva negativa que mostra o aumento de caráter epidêmico das demências no mundo, estudos recentes mostram uma tendência de diminuição da prevalência de demências em países desenvolvidos. A causa desse declínio é atribuída à redução e controle de fatores de risco, como aumento do nível de escolaridade em indivíduos idosos, diminuição do tabagismo, realização de atividades físicas e melhoria da alimentação, diminuição nas taxas de doenças infecciosas e controle de fatores de risco vasculares (Christensen et al., 2013; Langa et al., 2008; Lobo et al., 2007; Manton et al., 2005; Matthews et al., 2013; Rocca et al., 2011; Schrijvers et al., 2012).

1.4. Degeneração Lobar Frontotemporal (DLFT)

As DLFTs constituem um importante grupo de doenças neurodegenerativas incuráveis e incapacitantes (Jicha e Nelson, 2011). O termo Degeneração Lobar Frontotemporal é utilizado para agrupar doenças neurodegenerativas que possuem como característica neuropatológica em comum, a degeneração preferencial dos lobos frontal e temporal anteriores. (Cairns et al., 2007a). Já o termo Demência Frontotemporal é aplicado para denominar as síndromes clínicas associadas a essas mudanças neuropatológicas. Nos últimos 15 anos, a atenção à essas doenças tem aumentado, uma vez que foi verificado que as mesmas são tão frequentes quanto a doença de Alzheimer em indivíduos com menos de 65 anos (Ratnavalli et al., 2002). Evidências sugerem que as DFTs também são frequentes em populações mais idosas (Rosso et al., 2003).

Mundialmente, Ratnavalli et al. (2002), verificaram que a incidência das DFTs é de 15 por 100.000 pessoas na população entre 45 e 64 anos de idade. Mais recentemente um estudo verificou resultados semelhantes 15 a 22 por 100.000 pessoas (Onyike e Diehl-Schmid, 2013). Apenas um trabalho estudou a incidência dessas doenças em países da América Latina, variando de 1,2 a 1,8 casos por 1000 pessoas. Além disso, nesse mesmo trabalho foi verificado que a prevalência de DFTs na população do Brasil foi maior do que na população da Venezuela e do Peru (Custodio et al., 2013). A discrepância dos dados de incidência global de DFTs e na América Latina é um resultado das diferenças entre as populações estudadas, bem como devido às diferentes metodologias utilizadas para o diagnóstico em cada região. Esses dados mostram a urgência em melhoria das ferramentas diagnósticas para as DLFTs nos países da América Latina. Dentro desse contexto, é importante ressaltar que as DFTs são frequentemente diagnosticadas erroneamente como DA (Lindau et al., 2000; McKhann et al., 2001b), bem como confundidas com doenças psiquiátricas, como depressão e psicose (McKhann et al., 2001b; Mendez et al., 2007; Passant et al., 2005).

Historicamente, Arnold Pick foi o primeiro a descrever um paciente com afasia progressiva e atrofia lobar frontotemporal (Pick, 1892). Em 1991, Alois Alzheimer descreveu um relato histopatológico sobre esse tipo de paciente,

dando ênfase ao fato de que eles não apresentavam placas senis e emaranhados neurofibrilares típicos da DA, mas sim inclusões neuronais argirofílicas e células balonadas (células de Pick) (Alzheimer, 1991). No entanto, durante o século XX, pacientes com degeneração lobar frontotemporal foram genericamente classificados como pacientes com demência frontal, sendo frequentemente diagnosticados como DA (Snowden et al., 2002). Em 1994, os dois maiores grupos de pesquisa de Lund e Manchester propuseram critérios clínicos e neuropatológicos para DLFT (The Lund and Manchester groups, 1994) e em 1998, outro grupo reportou um consenso para o diagnóstico clínico das DLFTs para a Academia Americana de Neurologia (Neary et al., 1998). Atualmente, o termo Degeneração Lobar Frontotemporal é utilizado para reunir um conjunto de doenças que apresentam manifestações clínicas diferentes, mas possuem semelhanças neuropatológicas (Cairns et al., 2007b).

1.4.1. Manifestações clínicas das DLFTs

Em geral, as DLFTs apresentam-se de maneira insidiosa no início do seu curso, apresentando alterações de comportamento ou alterações de linguagem, seguido de declínio cognitivo, e então progredindo para um quadro demencial grave e generalizado, acompanhado por atrofia preferencial dos lobos frontais e temporais (Papma et al., 2013). Tipicamente, pacientes com DFT não apresentam perda de memória nos estágios iniciais da doença, diferentemente do que é verificado em pacientes DA (Liscic et al., 2007), mas existem exceções (Graham et al., 2005).

Os trabalhos mais recentes têm proposto o agrupamento dessas diferentes manifestações clínicas em dois grupos principais, a variante comportamental e a variante de linguagem, de acordo com aparecimento dos sintomas iniciais (Chare et al., 2014):

- 1) **Variante comportamental** (em inglês, *behavioural variant of FTLD*, sigla: *bvFTD*) caracterizada por mudanças comportamentais e de personalidade que estão associadas à

predominante degeneração cortico-frontal (McKhann et al., 2001a; Neary et al., 1998);

2) **Variantes de linguagem**, que pode ser manifestada como forma semântica ou afásica progressiva primária:

a) a semântica é caracterizada por problemas de nomeação e compreensão de palavras (em inglês, *semantic variant of Primary Progressive Aphasia*, sigla: svPPA) com preferencial acometimento do córtex temporal (Gorno-Tempini et al., 2011);

b) a afásia progressiva não fluente (em inglês, *non-fluent variant of Primary Progressive Aphasia*, sigla: nvPPA) apresenta-se principalmente, agramatismo, erros e distorções da fala (apraxia), afetando os córtices frontal e temporal (Gorno-Tempini et al., 2011).

3) **DFT associada a síndromes parkinsonianas ou doença do neurônio motor**, degeneração frontotemporal associada com aparecimento concomitante de síndromes motoras no curso da doença, como ELA, síndromes Parkinsonianas, Paralisia Supranuclear Progressiva (PSP) e Síndrome Corticobasal (SB) (Kertesz e Munoz, 2004; Liscic et al., 2008; Rohrer et al., 2011).

Alguns autores também incluem dentro da variante de linguagem, a variante logopênica (em inglês, *logopenic variant of Primary Progressive Aphasia*, sigla: lvPPA), que é caracterizada por uma alteração na recuperação lexical e repetição de sentença (Chare et al., 2014; Gorno-Tempini et al., 2011). No entanto, a inclusão desse tipo de manifestação clínica como uma das DLFTs é questionada por outros autores, uma vez que, em alguns casos, os achados neuropatológicos da variante logopênica são atípicos para DLFT, sendo reconhecidos nesses casos, achados da DA (Deramecourt et al., 2010; Mesulam et al., 2008).

As recentes descobertas realizadas nessa área coincidem com a publicação de séries de autópsias de diversos centros que têm elucidado correlações clinicopatológicas da DLFT com o desenvolvimento de marcadores moleculares que podem melhorar a previsão diagnóstica histopatológica

(Cairns et al., 2007b; Chare et al., 2014). A realização de análises genéticas direcionadas em pacientes e em membros da família também é importante para a determinação do subtipo histológico específico da DLFT (Cairns et al., 2007b). Conjuntamente, esses avanços têm criado oportunidade para desenvolver orientação e terapias específicas para as DLFTs (Rohrer et al., 2011). É importante ressaltar que atualmente a autópsia do encéfalo é a ferramenta padrão ouro para o diagnóstico específico subtipos de DLFT (Cairns et al., 2007b; Mackenzie et al., 2010).

1.4.2. Tipos neuropatológicos das DLFTs

As características neuropatológicas bem conhecidas nas DLFTs são: degeneração preferencial dos lobos frontal e temporal anteriores, vacuolização superficial, gliose e perda neuronal nas camadas superficiais do córtex (Cairns et al., 2007b; Neary et al., 1998). Segundo achados de autópsia, pacientes com DLFT demonstram atrofia preferencial grave dos lobos frontais e temporais anteriores (Brun, 1987; McKhann et al., 2001a). Essa atrofia pode atingir regiões posteriores do cérebro em estágios mais avançados da doença (Broe et al., 2003). Com relação às características microscópicas, observa-se perda neuronal e degeneração microvacuolar nas camadas I e II do córtex frontal e temporal, com grau variável de gliose. A substância branca adjacente apresenta desmielinização e gliose (Cairns et al., 2007b; Dickson et al., 1992; McKhann et al., 2001a).

Pacientes com DLFT e ELA associada apresentam também perda de neurônios motores superiores e inferiores, degeneração do trato corticoespinal e vacuolização (McKhann et al., 2001a).

No que diz respeito aos achados neuropatológicos de acordo com o tipo de proteína anormal encontrada, as DLFTs podem ser divididas em 5 principais classes (Bigio, 2013; Cairns et al., 2007b; Mackenzie et al., 2011):

- 1) **DLFT-tau:** alterações caracterizadas por inclusões neuronais e/ou gliais tau-imunoreativas;
- 2) **DLFT-TDP:** subtipo caracterizado por inclusões tau-negativas e positivas para TDP-43 e ubiquitina;

- 3) **DLFT-FUS**: subtipo caracterizado por inclusões tau e TDP-43 negativas, que são positivas para ubiquitina e FUS.
- 4) **DLFT-UPS (UPS - *ubiquitin proteasome system*)**: subtipo caracterizado por positividade apenas para ubiquitina.
- 5) **DLFT-ni (ni - *no inclusions*)**: casos em que não é verificado nenhum tipo de inclusão proteica (Bigio, 2013).

A associação entre subtipo clínico e neuropatológico das DLFTs é verificada, no entanto, essa relação é extremamente complexa e existe grande sobreposição entre manifestações clínicas e proteinopatias encontradas. A variante comportamental é geralmente associada com inclusões proteicas de TDP-43, mas alguns casos também são associados com achados neuropatológicos de tau. FUS é invariavelmente associada esse tipo de fenótipo clínico, sendo ele com ou sem sinais de doença do neurônio motor. A variante afásica não-fluente é associada com inclusões de tau e TDP-43, sendo as inclusões por tau predominantes desse subtipo clínico. A variável de linguagem semântica, está, na maioria dos casos, ligada à imunoreatividade dos agregados patológicos de TDP-43 e tau (Pan e Chen, 2013). Grande parte dos pacientes que apresentam variante de linguagem logopênica possuem neuropatologia de DA (Josephs et al., 2008a; Mesulam et al., 2008; Rohrer et al., 2012). Sintomas que acompanham o sistema extrapiramidal com apraxias são atribuídas a achados neuropatológicos de tau, incluindo DLFT com parkinsonismo, PSP e SB (Hoglinger et al., 2011; Neary et al., 2005; Spillantini et al., 1998). TDP-43 e FUS proteinopatias são mais comumente encontradas em DLFT associada com ELA (Boeve, 2011; Josephs et al., 2011; Rabinovici e Miller, 2010; Roeber et al., 2008).

1.4.3. DLFT-TDP

A proteína TDP-43 foi primeiramente descrita em 2006 por Neumann et al. (2006) como a proteína ubiquitinada presente em casos de DLFT com inclusões ubiquitina-positivas. Os autores produziram então anticorpos para reconhecer diferentes epítomos da proteína TDP-43 em humanos. Imunoistoquímica utilizando esses anticorpos em casos de DLFT, revelou a

presença de agregados proteicos no citoplasma de neurônios e células da glia (Neumann et al., 2006). Além disso, técnicas bioquímicas demonstraram que nos casos de doença, a proteína TDP-43 sofre modificações estruturais em sua composição como hiperfosforilação, ubiquitinação e perda da porção N-terminal da proteína (Igaz et al., 2008; Neumann et al., 2007; Neumann et al., 2006). Essas modificações resultam na perda de sua localização nuclear original e acúmulo anormal da proteína em compartimentos intracelulares citoplasmáticos.

Atualmente, anticorpos que reconhecem diversos epítomos da proteína já estão disponíveis comercialmente (Kwong et al., 2014). Existem anticorpos que reconhecem epítomos da proteína hiperfosforilada e anticorpos que reconhecem a proteína não fosforilada, ambos podem ser utilizados como ferramentas para o diagnóstico de DLFT-TDP e seus subtipos (Tan et al., 2013) como mostra a Figura 3.

Desde 2006 as características neuropatológicas da TDP-43 nos casos de DLFT-TDP têm sido amplamente estudadas. Atualmente, sabe-se que, além das inclusões intracitoplasmáticas neuronais e gliais (Figura 4A e B), outros tipos de inclusões da proteína TDP-43 são observados, como as inclusões intranucleares (Figura 4C e D) e os neuritos distróficos, caracterizados pelo acúmulo do proteína TDP-43 anormal em prolongamentos neuronais como axônios e dendritos (Figura 4E, setas).

Figura 3 - Padrões de marcação da proteína TDP-43 utilizando-se anticorpos contra diferentes epítomos da proteína (normal e hiperfosforilada). Em A, imunoistoquímica contra a conformação normal da proteína TDP-43, seta preta e diagrama em B representam células não acometidas com localização preferencialmente nuclear de TDP-43. Inclusões anormais também são verificadas com imunoistoquímica utilizando esse anticorpo (seta vermelha em A). Em C, imunoistoquímica contra a conformação anormal de TDP-43 resultando em marcação citoplasmática, também denominada como inclusões (seta vermelha). O diagrama em D mostra modificações bioquímicas de TDP-43 em células acometidas, bem como a localização preferencial subcelular desses achados. Fotomicrografias de imunoistoquímica pertencentes a arquivo próprio. Escala em A e C: 50µm. Diagramas adaptados de (Buratti e Baralle, 2008).

Figura 4 - *Diferentes tipos de inclusões da proteína TDP-43 em casos de DFLT-TDP.* Inclusões intracitoplasmáticas neuronais e gliais (A e B), inclusões intranucleares (C e D) e neuritos distróficos (E, setas). Escala A-D, 5 μ m e E 10 μ m. Adaptado de (Cairns et al., 2007b).

Todos esses tipos de alterações podem ser encontrados tanto na substância branca, como na substância cinzenta. Devido à heterogeneidade do tipo de inclusão e ao local preferencialmente acometido, critérios têm sido propostos para classificação de subtipos de DFLT-TDP. Esses critérios são baseados em achados clínicos, genéticos e neuropatológicos. Várias classificações já foram propostas, no entanto, a denominada *harmonized*, publicada em 2011 é a que tem sido mais amplamente utilizada e leva em consideração inclusive a frequência com que é verificado determinado subtipo, sendo A o mais frequente e assim sucessivamente (Mackenzie et al., 2011). Os quatro subtipos propostos são:

- 1) **Subtipo A:** caracterizado por inúmeros neuritos distróficos e inclusões intracitoplasmáticas neuronais (ICNs) em formas ovais ou de meia lua, concentrados primariamente na camada II do neocórtex. Número moderado de inclusões intranucleares neuronais (INNs) lentiformes podem também ser verificados, porém são menos comuns nesse subtipo (Figura 5A).
- 2) **Subtipo B:** apresenta número moderado de inclusões neuronais citoplasmáticas que estão presentes em todas as camadas corticais e apenas um pequeno número de neuritos distróficos (Figura 5B).
- 3) **Subtipo C:** observa-se predominância de neuritos distróficos alongados nas camadas mais superficiais do córtex com poucas inclusões intracitoplasmáticas neuronais (Figura 5C).
- 4) **Subtipo D:** refere-se a patologia de DLFT associada à doença óssea de *Paget*, causada por mutação no gene da VCP e caracterizada por numerosos neuritos distróficos curtos e frequentes (INNs) lentiformes (Figura 5D).

Figura 5 - *Subtipos neuropatológicos de DLFT-TDP.* Em A, subtipo neuropatológico A caracterizado por inúmeros neuritos distróficos (ND) e inclusões intracitoplasmáticas neuronais (ICNs) em formas ovais ou de meia lua, concentrados primariamente na camada II do neocórtex. Em B observa-se o subtipo B de DLFT-TDP, apresentando um número moderado de ICNs que estão presentes em todas as camadas corticais e um pequeno número de NDs. Em C, é verificada predominância de NDs alongados nas camadas mais superficiais do córtex com poucas ICNs, característico do subtipo C. O subtipo DLFT-TDP D (D) caracteriza-se por numerosos neuritos distróficos curtos e frequentes (INNs) lentiformes. Adaptado de (Josephs et al., 2011).

Em todos os subtipos, as inclusões são mais abundantes no giro denteado do hipocampo e nos neurônios das camadas superficiais dos córtices frontais e temporais (Cairns et al., 2007b; Neumann et al., 2006). No entanto, trabalhos também têm verificado essas inclusões em estruturas subcorticais (Grinberg et al., 2011; Josephs et al., 2009).

Com relação às alterações genéticas da DFLT-TDP, mutações em diversos genes têm sido verificadas e podem ser hereditárias ou autossômica dominantes (Bigio et al., 2013; Cairns et al., 2007b; Dejesus-Hernandez et al., 2011; Hasegawa et al., 2008; Mackenzie et al., 2007; Weihl et al., 2008). Abaixo, pode-se verificar a listagem dos genes cuja relação com DFLT-TDP já foi identificada:

- 1) Progranulina (PGRN),
- 2) *Vasolin-containing protein* (VCP),
- 3) TDP-43 (TARDBP),
- 4) Ubiquitina (UBQLN2),
- 5) c9orf72 (localizado no cromossomo 9).

Atualmente, sabe-se que DLFT-TDP é o subtipo patológico mais frequente de DFLT (somando até aproximadamente 50% dos casos) e pode apresentar-se nos três principais fenótipos clínicos descritos (subtópico 1.4.1 (Cairns et al., 2007b; Davidson et al., 2007).

Curiosamente, inclusões de TDP-43 são verificadas em pacientes com ELA esporádica ou autossômica dominante (Kuhnlein et al., 2008; Sreedharan et al., 2008). Essas observações apoiam a ideia de que exista forte relação clínica e patológica entre DLFT e ELA, evidenciando também o papel da TDP-43 no espectro dessas patologias.

Apesar de muitos avanços já terem sido realizados nessa área, existem ainda muitas questões em aberto com relação ao papel primário da TDP-43 na patogênese da DLFT e da própria função dessa proteína no SNC. Por exemplo, mutações no gene que codifica a TDP-43 têm sido raramente associadas á quadros clínicos de DLFT, além disso, os mecanismos pelos quais o acúmulo de TDP-43 leva á neurodegeneração ainda não estão muito bem elucidados

(Benajiba et al., 2009; Gijssels et al., 2009; Kovacs et al., 2009; Schumacher et al., 2009).

1.5. A proteína TDP-43: estrutura e função fisiológicas

O nome TDP-43, *transactive response DNA binding protein*, é derivado de sua descoberta em 1995, quando foi mostrado que essa proteína de 43kDA interagia com uma sequência de DNA do vírus HIV-1 (Ou et al., 1995). No entanto, foi somente a partir de 2006 (Neumann et al., 2006) é que despertou-se o interesse pelo estudo dessa proteína, incluindo o seu papel fisiológico na SNC, bem como sua estrutura bioquímica.

Atualmente sabe-se que a estrutura primária da TDP-43 é composta por 414 aminoácidos, contendo 2 motivos de reconhecimento de RNA (RRM1 e RRM2) e uma porção C-terminal rica em glicina que permite a ligação da molécula à simples fitas de DNA e RNA e também à proteínas (Buratti et al., 2006; Wang et al., 2008). Essa sequência de ligação à ácidos nucleicos e proteínas, é também denominada como domínio priônico (King et al., 2012). Sob condições normais, a proteína TDP-43 está localizada essencialmente no núcleo das células, no entanto, também pode ser transportada entre o núcleo e o citoplasma em um mecanismo auto regulatório dependente da sua região C-terminal (Ayala et al., 2005; Winton et al., 2008). A figura 6 ilustra a estrutura primária da proteína, bem como seus diferentes domínios.

Estrutura da proteína TDP-43

Figura 6 - *Estrutura primária da proteína TDP-43.* O diagrama mostra os diferentes domínios da proteína incluindo os motivos de reconhecimento de RNA (RRM1 e RRM2), regiões ricas em glicina e sinais de localização e exportação nuclear. Adaptado de (Kumar-Singh, 2011).

O gene TARDBP que codifica a TDP-43, está localizado no cromossomo 1 e é constituído por 6 exons, podendo expressar até 11 diferentes isoformas diferentes da proteína derivadas de *splicing* alternativo, sendo predominante a de 43kDa (Buratti et al., 2006; Wang et al., 2008). A TDP-43 é altamente conservada ao longo da evolução, fato que pode ser relacionado à importância de sua função (Ayala et al., 2005). Modelos animais *knockouts*, ou seja, que não expressam TDP-43, são letais para embriões devido a defeitos no período e pré-implantação (Wu et al., 2010).

Estudos têm sido feitos com o intuito de entender completamente a função fisiológica da proteína TDP-43. No entanto, diversas funções têm sido propostas para a TDP-43 através de experimentos de cultura celular, modelos animais e ensaios bioquímicos (Ash et al., 2010; Kabashi et al., 2010; Majumder et al., 2012; Vanden Broeck et al., 2013; Wegorzewska et al., 2009). A maioria dessas funções sugere o papel da TDP-43 na regulação do metabolismo de RNA em diversos níveis como em mecanismos de *splicing* (Buratti et al., 2005; Freibaum et al., 2010; Ling et al., 2010), e estabilização de RNA mensageiro (RNAm) (Ayala et al., 2005; Fiesel et al., 2010; Godena et al., 2011), tráfego de RNA (Alami et al., 2014; Narayanan et al., 2013) e síntese de microRNAs (Kawahara e Mieda-Sato, 2012). A TDP-43 exerce sua função interagindo com RNA, DNA e proteínas (Budini et al., 2014). Estudos que utilizaram a técnica de imunoprecipitação mostraram que a TDP-43 se liga a mais de 6000 espécies de RNA (Buratti et al., 2004; Polymenidou et al., 2011; Tollervey et al., 2011). Dentre os transcritos verificados, estão os envolvidos com atividade sináptica e crescimento neuronal (Polymenidou et al., 2011; Tollervey et al., 2011). A proteína TDP-43 também se associa com membros da famílias das ribonucleoproteínas nucleares (hnRNP), que são complexos que regulam mecanismos de *splicing* (Buratti et al., 2005; Freibaum et al., 2010; Ling et al., 2010). Foi verificado que a TDP-43 regula o mecanismo de *splicing* de fator de sobrevivência de neurônios motores (Shiga et al., 2012). Com relação à regulação de RNAm, a expressão de TDP-43 regula os níveis de RNAm de quinase dependente de ciclina tipo 6 (Ayala et al., 2008) que é um fator importante de regulação do ciclo celular; da histona desacetilase 6, que

regula expressão gênica (Fiesel et al., 2009; Fiesel et al., 2010), bem como na regulação de proteínas de neurofilamento e de associação a microtúbulos (Godena et al., 2011; Strong et al., 2007).

Além do papel bem caracterizado da TDP-43 na regulação da transcrição e do *splicing*, estudos têm sugerido seu papel em outros processos celulares como, apoptose e divisão celular (Ayala et al., 2008; Buratti e Baralle, 2008; Buratti e Baralle, 2010; Fiesel et al., 2009; Lagier-Tourenne et al., 2010; Strong, 2010; Strong et al., 2007; Vanden Broeck et al., 2013; Winton et al., 2008).

Diversos trabalhos demonstraram que a TDP-43 é recrutada para grânulos de estresse em resposta à injúria tecidual (Colombrita et al., 2009; Dewey et al., 2011; Freibaum et al., 2010; McDonald et al., 2011; Moisse et al., 2009a; Moisse et al., 2009b; Sato et al., 2009; Volkening et al., 2009). No tecido cerebral, foi mostrado que a redistribuição da proteína do núcleo para o citoplasma pode ser uma resposta normal à injúria neuronal (Moisse et al., 2009a; Sato et al., 2009). Além disso, estudos sugerem papel da TDP-43 na regulação da plasticidade neuronal, bem como na manutenção da integridade dendrítica e axonal (Lu et al., 2009; Swarup et al., 2012; Wang et al., 2008).

De maneira interessante, um estudo publicado recentemente demonstrou também que parkina (que é uma proteína componente do sistema ubiquitina proteasoma) é responsável pela ubiquitinação da proteína TDP-43 e subsequente acúmulo intracitoplasmático (Hebron et al., 2013). A TDP-43 interage também com outra proteína ligante de RNAs denominada FUS, também verificada em casos de DLFT e doença do neurônio motor (Freibaum et al., 2010; Ling et al., 2010). Esses dados apontam para a importância do equilíbrio de função e localização da TDP-43, bem como sua relação com o processo de doença. Um estudo recente sugere que a neurotoxicidade da proteína TDP-43 pode ser causada pela perda de sua função normal (Vanden Broeck et al., 2013).

Em modelos animais de camundongos, foi demonstrado que a TDP-43 está presente na membrana pré-sináptica das junções neuromusculares

(JNMs), sugerindo um papel dessa proteína no transporte de mRNAs para processos neuronais distais (Narayanan et al., 2013). Alami et al. (2014) recentemente identificaram uma nova função da proteína TDP-43 no SNC que vai de encontro com os achados de Narayanan et al. (2013). Os autores descobriram que essa proteína é responsável pelo transporte axonal anterógrado de mRNAs do corpo celular dos neurônios até compartimentos axonais distais, incluindo as JNMs.

1.6. A proteína TDP-43 e o processo de neurodegeneração

A questão central que permanece sobre a proteína TDP-43 é se a sua neurotoxicidade estaria relacionada à perda ou ao ganho de sua função. Diversos modelos animais mutantes para TDP-43 têm sido desenvolvidos para estudar os mecanismos relacionados à neurodegeneração.

Modelos de perda de função para TDP-43 foram estabelecidos em drosófila, neurônios corticais de camundongos e células IPS (*induced pluripotent stem cells*) (Alami et al., 2014). Essas são células derivadas de fibroblastos de pacientes com ELA que possuem mutação no gene da proteína TDP-43. São transformadas em neurônios motores para que processos celulares relacionados à doença possam ser estudados. Esse tipo de modelo experimental é uma forma de se estudar o mecanismo da doença *ex situ in vivo*. Os resultados derivados desses estudos mostraram que a TDP-43 tem papel no transporte neuronal de RNA. Foi verificado ainda que essa proteína associa-se às RNAs alvo, durante o transporte anterógrado e que, mutações no gene que a codificam danificam esse transporte *in vivo* em todos os modelos estudados.

Curiosamente, formas insolúveis de TDP-43, derivadas de pacientes com DFT e ELA, podem funcionar como sementes para agregados intracelulares de TDP-43 em cultura (Nonaka et al., 2013). O estudo concluiu que a TDP-43 possui propriedades priônicas, incluindo a habilidade de semear agregados proteicos intracelulares, estabilidade contra proteinases e contra o calor, e capacidade de transmitir esses agregados de célula para célula.

1.7. TDP-43 no envelhecimento normal

Grandes esforços na área científica, inclusive em nosso grupo, têm tido como foco revelar como ocorrem os processos degenerativos sofridos pelas células do SNC (Farfel et al., 2013; Grinberg, 2006; Grinberg et al., 2009a; Grinberg et al., 2009b; Leite, 2009; Suemoto et al., 2011), bem como para melhor descrever e caracterizar entidades patológicas que envolvem a neurodegeneração (Berg et al., 1998; Duyckaerts et al., 2009; Grinberg et al., 2009a; Grinberg et al., 2009b; Grinberg et al., 2011; Mackenzie et al., 2011; Mackenzie et al., 2009; Taylor et al., 2002).

Essas descobertas representam grande avanço científico e proporcionam melhor compreensão de mecanismos biológicos relacionados às doenças neurodegenerativas, auxiliando no diagnóstico e tratamento das mesmas. Entretanto, o papel dessas proteínas no processo de neurodegeneração ainda não é totalmente compreendido. Por exemplo, não está claro se o depósito dessas proteínas necessariamente representa um processo patológico, pois há indícios que essas mesmas inclusões podem ser encontradas no envelhecimento normal (Adler et al., 2010; Arnold et al., 2013; Berg et al., 1998; Bouras et al., 1994; Braak e Braak, 1997; Caselli et al., 2010; Crystal et al., 1993; Davies et al., 1988; Dickson et al., 1992; Gibb, 1986; Gibb e Lees, 1988; Josephs et al., 2008c; Klos et al., 2006; Price et al., 2009; Sabbagh et al., 2009; Schmitt et al., 2000; Villemagne et al., 2008; Wilson et al., 2011; Wolf et al., 1999).

Sabe-se que é necessário compreender melhor o processo fisiológico da senescência para então diferenciá-lo da selinidade. A compreensão da transição entre esses processos, pode contribuir para o desenvolvimento de medidas terapêuticas contra as doenças neurodegenerativas, o que ainda não existe.

A maioria dos estudos relacionados à proteína TDP-43 tem como foco a distribuição de suas inclusões em casos de doença e apresentam um número muito limitado ou inexistente de indivíduos controles (Amador-Ortiz et al., 2007; Nakashima-Yasuda et al., 2007; Uryu et al., 2008). A falta de controles em estudos que envolvem as doenças neurodegenerativas é inerente, devido ao

alto custo da prática de autópsias, e às leis que envolvem essa prática em outros países do mundo.

Poucos trabalhos se dedicaram a investigação do acúmulo anormal de TDP-43 em indivíduos idosos sem declínio cognitivo (Arnold et al., 2013; Geser et al., 2011; Wilson et al., 2011). Os resultados desses trabalhos demonstraram que a prevalência dos agregados de TDP-43 nesses indivíduos, variou de 3% a 36,4% (Arnold et al., 2013; Geser et al., 2010; Nakashima-Yasuda et al., 2007; Wilson et al., 2011). Devido a isso, são necessários estudos cujo desenho permita a análise de um grande número de casos, para que sejam apresentadas bases normativas consistentes sobre o papel dos achados anormais da TDP-43 no processo de senescência.

Dentro desse contexto, em relação à proteína TDP-43, nota-se a necessidade de um estudo clinicopatológico com descrição minuciosa da distribuição das inclusões anormais dessa proteína em um grande número de indivíduos controle. É importante que esse tudo englobe áreas encefálicas comumente atingidas nas DLFTs-TDP em sujeitos de faixa etária pré-senis a senis e de ambos os sexos. Apesar dessa abordagem ser essencialmente descritiva, abordagens semelhantes resultaram no entendimento dos estágios iniciais e progressão das alterações neurofibrilares na DA (Braak e Braak, 1991) e da progressão da DP (Braak et al., 2003). Algo que ainda não existe para a DLFT-TDP. Nossa hipótese é que o mapeamento aqui planejado possa revelar se há áreas de vulnerabilidade preferencial que poderiam apontar a localização inicial da doença, fatores de risco ou proteção contra o aparecimento dessas lesões nos encéfalos de indivíduos idosos. Além de contribuir para entendimento do papel dessas alterações no SNC durante o envelhecimento humano fisiológico, direcionando estudos posteriores.

2. OBJETIVO GERAL

Identificar a presença da proteína TDP-43 hiperfosforilada em cérebros humanos *post-mortem* de indivíduos acima de 50 anos sem histórico de declínio cognitivo e diagnóstico neuropatológico de DNDs em um grande número de casos.

2.1. Objetivos Específicos

Caracterizar a distribuição da proteína TDP-43 hiperfosforilada nesses indivíduos em diferentes áreas encefálicas envolvidas nas DLFTs.

Identificar associação de variáveis clínicas, sociodemográficas ou neuropatológicas com o aparecimento das inclusões de TDP-43 em indivíduos cognitivamente normais, para determinar possíveis fatores que possam influenciar a presença dessas lesões.

3. METODOLOGIA

3.1. Contribuição do Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral (BEHGEEC) para a realização do estudo e de pesquisas científicas na área

O Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral (BEHGEEC) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) foi fundado com o objetivo de coletar encéfalos de indivíduos idosos que faleceram com mais de 50 anos de idade e apresentavam qualquer grau cognitivo, para estudos de correlação clinicopatológica em envelhecimento cerebral fisiológico e demências (Grinberg et al., 2007). O BEHGEEC desde então, tem obtido grande sucesso, graças à colaboração do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital de São Paulo (SVOC-SP), que constitui o maior serviço de autópsia de casos naturais do Brasil e da generosidade dos familiares dos pacientes falecidos encaminhados para este serviço. Com isso, em 10 anos, foram coletados 3000 encéfalos, sendo que 70% desses encéfalos pertenciam a sujeitos sem déficit cognitivo. Dessa maneira, o BEHGEEC-FMUSP diferencia-se dos outros bancos de encéfalo do mundo que basicamente não possuem casos controles em suas coleções (Kretzschmar, 2009). Isso possibilita ao nosso grupo o estudo mais aprofundado do envelhecimento cerebral humano, bem como da diferenciação entre senescência e senilidade.

O *status* cognitivo, funcional e socioeconômico dos casos incluídos no banco é avaliado por meio de um informante, aplicando-se escalas e questionários semi-estruturados bem caracterizados. Além disso, após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido pelo informante, os casos são coletados e submetidos a avaliações macroscópicas e microscópicas que seguem critérios internacionais para envelhecimento cerebral e doenças neurodegenerativas (Ferretti et al., 2010a; Grinberg et al., 2007). Todos os procedimentos do BEHGEEC, bem como os realizados nesse estudo, foram aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP, sob os protocolos números 458.272/13 e 464/11, respectivamente (Anexos 1 e 2).

Tendo em vista a complexidade da rotina, assim como o número de informações coletadas para a inclusão de cada caso no BEHGEEC, faz-se necessário descrever de maneira mais detalhada, os critérios de inclusão de casos e os métodos padrão de rotina do banco de especial importância para a realização desse estudo. Esse conteúdo pode ser encontrado no tópico 3.2 e seus respectivos subtópicos (3.2.1, 3.2.2, 3.2.3 e 3.2.4). Os métodos prospectivos realizados nesse trabalho, estão descritos no tópico 3.3 incluindo os métodos de seleção de casos (3.3.1), abordagem e justificativa sobre áreas encefálicas de interesse (3.2.2), demais métodos histopatológicos (3.3.3, 3.3.4, 3.3.5), coleta de dados para análises exploratórias de TDP-43 e variáveis sociodemográficas, neuropatológicas e clínicas (3.3.6) e análises estatísticas (3.3.7).

3.2. Métodos retrospectivos

3.2.1. Critérios de seleção

Os encéfalos que constituem a casuística do BEHGEEC são provenientes do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da Universidade de São Paulo (SVOC-USP). O SVOC-USP é responsável por esclarecer causas de óbito por morte natural decorrentes de moléstias mal definidas de indivíduos que faleceram na região metropolitana de São Paulo. Para que o caso seja incluído na casuística do BEHGEEC, deve atender aos seguintes critérios:

- 1) Ter idade, na data do falecimento, igual ou maior que 50 anos;
- 2) Possuir um familiar responsável ou cuidador, que convivesse com o sujeito no mínimo semanalmente, nos seis meses anteriores ao óbito. O informante (familiar responsável ou cuidador) deve ser capaz de prestar informações consistentes a respeito do histórico de saúde do sujeito;
- 3) Não ser portador de doenças cerebrais que impossibilitem a avaliação macroscópica cerebral, como acidente vascular encefálico hemorrágico;

- 4) Não apresentar doença avançada no período de três meses anteriores à morte, responsáveis por causar hipóxia ou hipofluxo cerebral;
- 5) Não apresentar histórico de parada cardiorespiratória prolongada nos três meses anteriores ao óbito;
- 6) Não possuir indicação de acidose grave, devido ao estado agonal (indicador: pH do líquido cefalorraquidiano <6,5).

3.2.2. Avaliação clínica e funcional

Os familiares que vão ao SVOC para reclamar o corpo são convidados pela equipe de entrevista clínica a participar do estudo. Essa equipe é composta por enfermeiros especializados e capacitados para identificar o *status* clínico e funcional dos indivíduos falecidos, por meio de um questionário aplicado ao informante. Além disso, a equipe é treinada para reconhecer condições físicas e emocionais do informante para a participação no estudo, e possíveis fatores que possam interferir na confiabilidade dos dados. Após a triagem detalhada dessas condições, o enfermeiro realiza a entrevista oralmente, seguindo o questionário-semiestruturado com base nas escalas que já foram validadas em nossa população (Ferretti et al., 2010a).

O diagnóstico neurológico de demência no BEHGEEC é baseado nos critérios do *DSM-IV*, que é um sistema de classificação de transtornos mentais e de comportamento (OMS, 1993). O grau de déficit cognitivo é avaliado utilizando-se o Questionário *Clinical Dementia Rating* (CDR, somente a sessão do informante (Morris, 1993) e o *Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly* (IQCODE (Jorm, 1994). O CDR é uma escala de 5 pontos para classificação de severidade de demência, no qual 0 significa sem declínio cognitivo, 0,5 indica demência questionável e os estágios 1, 2 e 3 correspondem à demência leve, moderada e grave, respectivamente. O IQCODE é um questionário para detecção do declínio cognitivo com base no relato do informante que compara o estado cognitivo do mesmo indivíduo, com o seu *status* há 10 anos atrás. É uma escala composta por 26 questões, cada uma delas com pontuação de 1 a 5 de acordo com a gravidade dos sintomas apresentados. O escore final é obtido através da divisão do escore total pelo

número de questões. Indivíduos que obtêm escore final de <3,42 são considerados cognitivamente normais (Ferretti et al., 2010b).

Além da avaliação cognitiva, é também realizada avaliação comportamental pela utilização do Inventário Neuropsiquiátrico (INP) e a escala *SCID* do *DSM-III-R* para acessar Mania e Depressão (Spitzer et al., 1992). A avaliação funcional é realizada pelo Índice de Katz para a avaliação de atividades de vida diária (Katz et al., 1963) e a avaliação motora, pela escala de Parkinsonismo de Tanner.

Outras escalas são aplicadas para o conhecimento de dados socioeconômicos. Dados sociodemográficos também são coletados, como idade, escolaridade e raça. A tabela 1 mostra os domínios avaliados pelo questionário-semiestruturado do BEHGEEC, bem como as respectivas escalas. O Anexo 3 contém a entrevista clínica que é aplicada ao familiares na íntegra.

Tabela 1 - Escalas utilizadas rotineiramente pelo BEHGEEC para avaliação de domínios cognitivos e obtenção de informações sócioeconômicas. Adaptado de (Grinberg et al., 2007).

Domínio	Escala
Avaliação Sócio-econômica	ABIPEME (Associação Brasileira de Institutos de Pesquisa e Mercado)
Avaliação Funcional	Índice de Katz (<i>Instrumental Activities of Daily Life, IADL</i>)
Avaliação Comportamental	Inventário Neuropsiquiátrico – INP (<i>Neuropsychiatric Inventory, NPI</i>)
Avaliação Cognitiva	<i>Clinical Dementia Rating - CDR</i> <i>Informant Questionnaire on Cognitive Decline – IQCODE</i>
Distúrbios Afetivos	Mania e Depressão (<i>Structure Clinic Interview for DSM-III-R, SCID</i>)
Parkinsonismo	Escala de Parkinsonismo (Tanner)

3.2.3. Processamento encefálico

Após o informante realizar a entrevista clínica e assinar o termo de consentimento de Livre e Esclarecido, o encéfalo é coletado, volumado e processado. No que diz respeito ao processamento, primeiramente, o tronco encefálico é separado do cérebro na altura do pulvinar do tálamo e os hemisférios cerebrais separados por secção no corpo caloso. São então amostradas 12 áreas cerebrais do hemisfério direito à fresco. Essas amostras

são congeladas a -80°C para posteriores estudos bioquímicos e genéticos. O hemisfério esquerdo é fixado por imersão em formalina 4% (tamponado com fosfato de potássio, pH= 7,4) por 15 dias. Após esse período, o material encefálico é seccionado coronalmente em intervalos de 1cm e as áreas encefálicas determinantes para o diagnóstico *post mortem* das doenças neuronegenerativas são amostradas. As regiões encefálicas representadas e fixadas em paraformol, são então embebidas em blocos de parafina. Durante o processamento, também é realizado o diagnóstico de alterações macroscópicas, como atrofas e lesões vasculares, quando encontradas. A tabela 2 mostra todas as áreas amostradas rotineiramente pelo BEHGEEC, tanto as áreas retiradas à fresco, para análise bioquímica, quanto aquelas embebidas em parafina utilizadas para o diagnóstico anatomopatológico.

Tabela 2 - Regiões amostradas rotineiramente segundo o protocolo do BEHGEEC para criopreservação e exame anatomopatológico. Adaptado de (Grinberg et al., 2007).

Áreas Encefálicas Amostradas	Embebidos em parafina	Congelados a -80°C
Amígdala e córtex entorrinal	X	X
Bulbo olfatório	X	X
Cerebelo incluindo o núcleo denteado	X	X
Centro semioval	X	
Formação hipocampal (porção anterior)	X	
Hipocampo na altura do corpo geniculado lateral e giro temporal inferior	X	X
Hipocampo contralateral	X	
Núcleo basal incluindo o núcleo basal de Meynert, na altura da comissura anterior	X	
Giro do cíngulo		X
Giro frontal médio	X	X
Giro frontal superior e giro do cíngulo anterior na altura do gânglio basal anterior	X	
Giro orbitofrontal		X
Giro parahipocampal		X
Giro temporal médio e superior	X	X
Lóbulo parietal inferior e superior	X	X
Medula oblonga	X	
Mesencéfalo incluindo substância negra	X	
Plexo coróide	X	X
Ponte incluindo o lócus coeruleus	X	
Sulco calcarino (área visual primária, área de Broadmann 17)	X	X
Tálamo	X	
Território de transição entre as artérias cerebrais anterior e média	X	
Território de transição entre as artérias cerebrais média e posterior	X	

3.2.4. Exame anatomopatológico

Os blocos de parafina, contendo as regiões encefálicas de interesse, foram seccionados em espessura de 7µm e submetidos à coloração por Hematoxilina-Eosina (H&E) e reação imunohistoquímica.

Para reação imunohistoquímica, após reidratação do tecido em bateria de álcool, as lâminas histológicas foram incubadas em água oxigenada a 3% para bloqueio das peroxidases endógenas. Duas etapas de recuperação antigênica foram realizadas: (1) lâminas mergulhadas em ácido fórmico a 85%

por 5min; (2) lâminas mergulhadas em solução tampão de citrato 10mM, em autoclave por 5min a 105°C. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado com solução de leite 5% e Triton-X 1% (Sigma-Aldrich Corporation, St Louis, USA). Os anticorpos primários foram incubados utilizando-se a mesma solução *overnight* a 4°C. Depois de incubação com anticorpos secundários espécie-específicos, as reações foram detectadas utilizando-se o método Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Diaminobenzidina foi utilizada como cromógeno (Vector labs, Burlingame, USA). As lâminas foram contracoradas utilizando-se Hematoxilina de Harris (Merk, Darmstadt, Alemanha). A detecção das inclusões das proteínas anormais foi realizada utilizando-se os seguintes anticorpos primários contra: β -amilóide (4G8, 1/5000, Signet Laboratories, Dedham, MA, USA), tau-hiperfosforilada (PHF-1, 1/1000, cedido por Peter Davies, Nova Iorque, NY, USA) e α -sinucleína (EQV-1, 1/10 000, cedido por Kenji Ueda, Tokio, Japão).

O diagnóstico anatomopatológico foi realizado de acordo com critérios internacionalmente aceitos (Braak e Braak, 1991; McKeith et al., 1996; Mirra et al., 1991), como já descrito anteriormente pelo nosso grupo. Resumidamente, as placas neuríticas são classificadas de acordo com a quantidade de β -amilóide seguindo uma escala de 4 pontos como estabelecido pelo *Consortium to Establish a Register for Alzheimer's disease* (CERAD (Mirra et al., 1991). A distribuição da proteína tau-hiperfosforilada na forma de emaranhados neurofibrilares (ENFs) foi estabelecida de acordo com o sistema de estadiamento de Braak e Braak que leva em consideração ambos, quantidade de ENFs e o local acometido pelas alterações em uma escala crescente de 0 a 6 (Braak e Braak, 1991). O estadiamento dos corpúsculos e neuritos de Lewy foi realizado de acordo com os critérios propostos que também leva em consideração quantidade e regiões acometidas (Braak et al., 2003). Amplos critérios neuropatológicos conhecidos e aceitos foram utilizados para outras doenças neurodegenerativas por corpúsculos de Lewy (McKeith et al., 1996). Alterações vasculares foram analisadas semi-quantitativamente usando as amostras coradas por H&E de acordo com análises sistemáticas para cada tipo de alteração, como previamente descrito (Grinberg et al., 2013).

Todos os casos foram revisados pela mesma neuropatologista de forma cega para o *status* clínico, funcional e sociodemográfico do caso.

A tabela 3 mostra as áreas encefálicas imunocoradas para cada anticorpo. Essas regiões e colorações são amplamente utilizadas no diagnósticos de DNDs (Braak e Braak, 1991; Braak e Del Tredici, 2004; Braak et al., 2004; McKeith et al., 1996; McKhann et al., 2001a; Mirra et al., 1991; Murayama e Saito, 2004; NIA-RR, 1997).

Tabela 3 - Áreas imunocoradas e anticorpos rotineiramente utilizados no BEHGEEC
Adaptado de (Grinberg et al., 2007).

Região do encéfalo	H&E	Proteína: Amilóide Anticorpo 4G8	Proteína: Tau Anticorpo PHF-1	Proteína: Sinucleína Anticorpo α -synuclein
Giros frontais médio e inferior	X	X	X	
Giros temporais médio e inferior	X	X	X	X
Giro angular	X	X	X	
Córtex visual	X	X	X	
Giro do cíngulo anterior	X	X	X	X
Hipocampo	X	X	X	X
Amígdala	X	X	X	X
Núcleos basais na altura da comissura anterior	X	X		
Tálamo	X			
Mesencéfalo	X	X	X	X
Ponte	X	X		X
Medula oblonga	X	X		X
cerebelo	X	X		
Bulbo olfatorio	X			X

X = área imunocorada

3.3. Métodos prospectivos

3.3.1. Seleção dos casos

Tendo em vista o objetivo de caracterizar as alterações da proteína TDP-43 no envelhecimento normal em um grande número de casos, distribuídos igualmente por faixa etária e gênero, a ideia inicial do trabalho para a seleção dos casos, era a inclusão de casos disponíveis que atendiam aos critérios restritos para esse estudo. Esses critérios foram os seguintes:

- 1) pertencer à casuística do BEHGEEC;
- 2) ter idade, na data do óbito, igual ou maior que 50 anos;
- 3) não apresentar déficit cognitivo (escore do CDR=0 e IQCODE<3,42);
- 4) apresentar diagnóstico anatomopatológico caracterizado como normal (ausência de critérios para classificar qualquer tipo de doença neurodegenerativa).

A tabela 4, mostra o número de casos desejados por faixa etária e gênero, bem como o número de casos que estavam disponíveis para sorteio no início do projeto.

Tabela 4 - Número de casos por grupo, número de casos já caracterizados e número de casos disponíveis no início do projeto para sorteio de acordo com gênero e faixa etária, para a caracterização de inclusões da proteína TDP-43.

		Total desejado	Disponível com AP	Disponível sem AP*
50-59	F	50	29	156
	M	50	46	339
60-69	F	50	32	194
	M	50	48	307
70-79	F	50	34	194
	M	50	30	228
80-89	F	50	36	182
	M	50	32	137
TOTAL		400	287	1737

O preenchimento dos grupos seria realizado de maneira aleatória dentro dos critérios propostos.

3.3.2. Regiões encefálicas de interesse

As áreas de interesse do estudo foram, hipocampo, amígdala, giro temporal superior e médio, giro frontal médio, cíngulo anterior e colículo superior. Todas essas regiões são coletadas rotineiramente no BEHGEEC (Tabela 2) e estão envolvidas nas DLFTs como descrito abaixo.

Com relação ao hipocampo, diversos estudos já verificaram que é a região neuroanatômica consistentemente afetada nas entidades patológicas

com inclusão de TDP-43, mais especificamente na camada granular do giro dentado (Amador-Ortiz et al., 2007; Hu et al., 2008; Johnson et al., 2007; Josephs et al., 2004). Além disso, inclusões de TDP-43 na DLFT são mais abundantes nessa mesma região hipocampal (Cairns et al., 2007b).

A amígdala também se apresenta frequentemente afetada nas DLFT-TDP e é provavelmente a área mais vulnerável na DLFT-TDP tipo C (Mackenzie et al., 2011).

Os giro frontal médio e temporal inferior se encontram frequentemente afetados nas DLFT-TDP (Cairns et al., 2007b).

O interesse no cíngulo anterior se dá devido ao acometimento precoce das células de von Economo (VENs) na DLFT-TDP (Seeley et al., 2006). O estudo realizado por Seeley et al. (2006) verificou perda precoce, severa e seletiva dos VENs em DLFT-TDP, em especial na variante comportamental (Kim et al., 2012). Acredita-se que esses grandes neurônios bipolares exercem funções relacionadas às capacidades sociais e emocionais e estão presentes apenas em algumas subordens de primatas (Nimchinsky et al., 1999).

O colículo superior é uma área cortical localizada no teto do mesencéfalo. Ele faz parte dos núcleos pré-motores oculares (Rub et al., 2009) e em humanos, participa do controle dos movimentos sacádicos horizontais e congelamento do olhar. Essa área se mostra envolvida em todos os tipos de DLFT-TDP (Grinberg et al., 2011).

3.3.3. Caracterização do caso controle positivo e padronização do protocolo de imunohistoquímica para a proteína TDP-43 hiperfosforilada

O protocolo de imunohistoquímica para a proteína TDP-43 hiperfosforilada ainda não estava padronizado e não fazia parte da rotina para diagnóstico anátomopatológico no BEHGEEC. Dessa forma, para a realização desse trabalho, diferentes testes foram realizados com o intuito de obter-se marcação fidedigna da proteína e identificação das inclusões de TDP-43.

Foram utilizados diferentes tipos de recuperação antigênica (por calor, ácido fórmico ou enzimática) e concentrações de anticorpo primário. O anticorpo primário utilizado em todos os casos foi o anti-humano, produzido em camundongo (Cosmo

Bio, Tokyo, Japan) que possui afinidade por dois sítios específicos de fosforilação da TDP-43 (serina409/serina410), reconhecendo apenas a conformação patológica da proteína (hiperfosforilada). Após os testes, foi verificado que o processo combinado de recuperação antigênica, química (com ácido fórmico 85%) e por temperatura (em autoclave a 105°C por 5 minutos) foi necessário para melhor exposição dos epítomos da TDP-43, e que a diluição de 1:1000 foi a ideal para o reconhecimento das inclusões.

A padronização do protocolo de imunohistoquímica para a proteína TDP-43 fosforilada, foi realizada em caso de DLFT-TDP, com confirmação neuropatológica também realizada especificamente nesse trabalho. Possuíamos 3 casos com diagnóstico clínico em vida de DLFT realizado por neurologistas colaboradores que encaminharam os casos para o BEHGEEC. Esses três casos foram processados e submetidos à técnica de imunohistoquímica para as proteínas tau hiperfosforilada, como realizado rotineiramente e TDP-43 hiperfosforilada, seguindo o protocolo padronizado nesse trabalho. Desses três casos analisados, um apresentou positividade para a proteína TDP-43 e ausência de marcação para proteína tau, o que é característico de DLFT-TDP (MACKENZIE *et al.*, 2011). A figura 6 mostra as inclusões da proteína TDP-43 hiperfosforilada nas regiões de interesse do estudo, córtex temporal, hipocampo, amígdala, frontal e giro do cíngulo (Figura 7A-E). Nota-se a presença de diferentes tipos de inclusão de TDP-43 como intracitoplasmática neuronal e neuritos distróficos, bem como vacuolização do tecido, que é também uma característica neuropatológica desse tipo de DLFT. Esse caso foi posteriormente classificado como DLFT-TDP do subtipo A e utilizado como controle positivo para todos os casos. O caso caracterizado como DLFT-tau foi utilizado como controle negativo (Figura 7F).

Figura 7 - *Caso DLFT-TDP utilizado como controle positivo em todas as reações imunohistoquímicas realizadas nesse estudo. Inclusões de TDP-43 podem ser verificadas em todas as regiões cerebrais de interesse: córtex temporal (A), hipocampo (B), amígdala (C), córtex frontal (D) e giro do cíngulo (E). Neuritos distróficos podem ser verificados com mais evidência em A, D e E (setas) e inclusões intracitoplasmáticas na fascia denteada do hipocampo (seta, B). Nota-se também microvacuolização do tecido, outra característica neuropatológica de DFLT-TDP, principalmente no córtex frontal e no giro do cíngulo (asteriscos, D e E). A fotomicrografia em F demonstra a fascia denteada do hipocampo do caso de DLFT-tau, utilizado como controle negativo. Escala: 20µm*

3.3.4. *Diagnóstico neuropatológico da proteína TDP-43 nos indivíduos estudados*

Na primeira etapa do trabalho foram analisadas três regiões cerebrais de interesse: hipocampo, amígdala e giro temporal superior/médio. Essas áreas foram escolhidas para triagem de acordo com os trabalhos publicados anteriormente (Arnold et al., 2013; Geser et al., 2011; Nakashima-Yasuda et al., 2007; Wilson et al., 2011).

Para essa etapa, os blocos de parafina contendo essas regiões foram seccionados em cortes de 7µm, colocados em banho maria a 37°C e pescados com auxílio de lâminas sinalizadas. Após secagem em estufa a 37°C por aproximadamente 24 horas, as lâminas foram submetidas ao protocolo de imunohistoquímica para a proteína TDP-43 hiperfosforilada descrito anteriormente (subtópico 3.2.3).

Após montagem e secagem das lâminas, iniciou-se a investigação das alterações da proteína TDP-43 no envelhecimento normal. A análise de todos os casos foi realizada por um único observador que estava cego para as informações clínicas e demográficas do caso. Além disso, o exame foi realizado de maneira sistemática. As lâminas contendo os fragmentos representativos das áreas de interesse, foram percorridas por toda a sua extensão. O caso foi considerado positivo quando, qualquer tipo de inclusão de TDP-43 (inclusões intranucleares, inclusões intracitoplasmáticas, neuritos distróficos e inclusões gliais) foi encontrado em, pelo menos, uma das regiões de interesse na triagem (hipocampo, amígdala e giro temporal superior/médio). Quando as inclusões eram encontradas, foram anotados os tipos de inclusão encontrados, bem como a região acometida.

Os casos positivos foram revisados por análise duplo-cega de dois pesquisadores independentes. Os mesmos também não tinham acesso às informações sociodemográficas do caso, tampouco ao diagnóstico inicial de TDP-43.

3.3.5. Análise das demais áreas encefálicas de interesse

Os casos diagnosticados como positivos foram submetidos aos mesmos protocolos de imunohistoquímica e exame neuropatológico para TDP-43 fosforilada para análise das demais regiões de interesse: o cíngulo anterior, o giro frontal médio e o colículo superior.

3.3.6. Análise de associação de TDP-43 fosforilada e características clínicas, sociodemográficas e neuropatológicas

Com o objetivo de explorar associações entre variáveis clínicas, sociodemográficas e neuropatológicas, e a presença das inclusões de TDP-43, os dados provenientes das entrevistas clínicas e da planilha de diagnóstico neuropatológico do foram tabulados para posteriores análises estatísticas.

Os dados clínicos extraídos da entrevista realizada com o informante foram: o escore do IQCODE e o escore total Inventário Neuropsiquiátrico (INP) bem como de seus subitens. Enquanto que os dados sociodemográficos foram: idade, gênero, escolaridade e raça. Quando os indivíduos eram de raça asiática, uma segunda consulta foi realizada nos arquivos do SVOC para verificar o local de nascimento desses indivíduos.

Com relação aos achados neuropatológicos, foram utilizados dados referentes ao estadiamento de Braak, Consórcio CERAD, sinucleinopatias, infartos lacunares e esclerose hipocampal.

3.3.7. Análises estatísticas

Análise descritiva foi demonstrada para todas as variáveis estudadas (idade, gênero, escolaridade, raça, estágio de Braak, CERAD, sinucleinopatias, infartos lacunares, esclerose hipocampal, IQCODE e INP e seus subitens).

Foi investigada a associação de variáveis sociodemográficas, neuropatológicas e clínicas com a presença de inclusões de TDP-43. Para isso, TDP-43, CERAD, lesões vasculares, esclerose hipocampal, sinucleinopatias, escore total do INP e escore de cada um dos seus subitens, foram analisadas como variáveis binárias. TDP-43 foi categorizada como positiva ou negativa, enquanto CERAD foi categorizado como presença de placas neuríticas (CERAD=0) ou ausência de placas neuríticas (CERAD>0). Sinucleinopatias,

lesões vasculares e esclerose hippocampal foram considerados como presença ou ausência de alterações. Estágio de Braak foi categorizado em 3 grupos (I ou II ou $\geq$ III). INP e cada subitem foram como categorizados com alterado (escore de INP $\geq$ 1) ou normal (escore de INP=0). Para as análises univariadas, testes t não pareados foram utilizados para avaliar a associação entre positividade de TDP-43 e variáveis contínuas. Teste ANOVA um fator foi realizado para investigar se os grupos raciais eram similares com relação à escolaridade, utilizando-se *post hoc* teste de correção de Bonferroni para comparação dois por dois entre os grupos. Qui-quadrado ou teste exato de Fisher foram utilizados para determinar associação entre TDP-43 e variáveis categóricas. Modelos de regressão logística multivariada ajustados para gênero, idade, escolaridade e estágio de Braak foram utilizados para investigar a associação entre TDP-43 e etnicidade. Nas análises multivariadas, a raça caucasiana foi utilizada como referência. Utilizamos também regressão logística multivariada para investigar associação entre estágios de Braak e TDP-43, ajustado para idade, gênero e escolaridade. Os resultados foram considerados significantes quando o valor de p foi $<0,05$. As análises estatísticas serão realizadas utilizando-se os programas SPSS versão 16 (IBM, Chicago, USA) e SAS 9.3 (Cary, NC, USA).

4. RESULTADOS

4.1. Casos estudados

Esse estudo fez uso de material encefálico coletado e processado pelo BEHGEEC-FMUSP entre o período de 2004 e 2013. Dentro desse período, 2.143 indivíduos com idade acima de 50 anos haviam sido classificados clinicamente como normais (de acordo com o escore de CDR obtido). Um total de 889 indivíduos tiveram análise neuropatológica completa e desses, 423 foram diagnosticados como normais após exame anatomopatológico. Foram excluídos 100 casos: (1) 48 por ausência de regiões encefálicas de interesse do estudo; e (2) 52 devido à qualidade comprometida do tecido cerebral, que foi verificada após etapa de imunohistoquímica para TDP-43 e impossibilitou a análise microscópica das alterações da proteína.

A tabela 5 mostra o número e a porcentagem de casos desejados (n=400) e incluídos (n=323) por faixa etária e gênero. Um total de 80,75% dos casos desejados foi incluído.

Tabela 5 - Tabela referente ao número e porcentagem de casos desejados e analisados de acordo com gênero e faixa etária.

		Total desejado	Total analisado	Total analisado em %	Total analisado por faixa etária em %
50-59	F	50	29	58	
	M	50	43	86	72
60-69	F	50	40	80	
	M	50	44	88	84
70-79	F	50	51	102	
	M	50	43	86	94
80-89	F	50	34	68	
	M	50	39	78	73
TOTAL		400	323	80,75	80,75

4.2. Análise descritiva

A média de idade dos indivíduos cognitivamente normais estudados foi de 69,9 anos ($\pm 11,7$ anos), a média de escolaridade 5,1 anos ($\pm 4,1$ anos) e 52,3% eram do gênero feminino. O total de 61,6% eram caucasianos, 26,9% negros ou pardos e 11,5% asiáticos. A média do escore do IQCODE foi de 3,00 ($\pm 0,03$) e 47,1% dos indivíduos apresentaram escore do INP alterado (escore do INP ≥ 1). Com relação aos achados neuropatológicos, 83% dos participantes mostraram ausência de placas neuríticas (CERAD=0) e 85% tinham estágio de Braak <II, 2,2% apresentaram sinucleinopatias restritas ao tronco encefálico, 3,7% infartos lacunares e 3,4% esclerose hipocampal. Do total de 323 sujeitos analisados, 34 (10,5%) apresentaram inclusões de TDP-43, em pelo menos, uma das regiões encefálicas de interesse (córtex temporal, hipocampo e amígdala).

4.3. Características sociodemográficas, clínicas e neuropatológicas dos indivíduos TDP-43 positivos: análises univariadas

Para as análises univariadas os indivíduos foram divididos em dois grupos de acordo com a presença ou não dos achados neuropatológicos de TDP-43. Essas análises demonstraram que os indivíduos TDP-43 negativos e positivos diferiram em idade, estágio de Braak e raça (Tabela 6). Teste t não pareado demonstrou que a média de idade dos indivíduos TDP-43 positivos (74,0, DP $\pm 12,3$) foi significativamente maior do que a dos TDP-43 negativos (69,3, DP $\pm 11,4$, $p=0,03$). A variável raça foi associada à TDP-43, principalmente em asiáticos ($p=0,002$). A positividade de TDP-43 foi associada com estágios de Braak $\geq$ III ($p=0,03$). Os grupos não diferiram em gênero, escolaridade, CERAD, sinucleinopatias, infartos lacunares, esclerose hipocampal, escore do IQCODE ou sintomas neuropsiquiátricos (escore total do INP ou escore individual de cada subitem, $p>0,05$ para todos).

Tabela 6 - Características dos indivíduos TDP-43 positivos e negativos (n=323).

Característica	TDP negativo (n=289)	TDP positivo (n=34)	p
Sociodemográficos			
Idade (anos), média (DP)*	69,4 (11,3)	74,0 (13,3)	0,03
Gênero, feminino, %[†]	51,6	58,8	0,42
Raça, %[‡]			
. Caucasiana	62,6	52,9	0,002
. Negra + Parda	28,0	17,7	
. Asiática	9,3	29,4	
Escolaridade (anos), média (DP)*	5,1 (4,1)	5,3 (4,7)	0,76
Achados neuropatológicos			
Estágio de Braak, %[‡]			
. 0	32,5	26,5	0,03
. I-II	55	44,1	
. >III	12,5	29,4	
CERAD[‡]			
. 0	84,1	73,5	0,14
. A, B ou C	15,9	26,5	
Sinucleinopatias, %[‡]			
. 0	98,2	94,1	0,12
. ≥ 1	1,8	5,9	
Infarto lacunar, %[‡]	4,1	0	0,25
Esclerose hipocampal, %[‡]	2,8	8,8	0,16
Clínicos			
IQCODE, média (DP)*	3,00	3,00	0,75
Sintomas neuropsiquiátricos			
NPI ≥ 1, %	48,3	38,2	0,26
Delírios, n (%) [‡]	2,1	2,9	1
Alucinações, n (%) [‡]	2,8	5,9	0,60
Depressão, n (%) [†]	15,3	11,8	0,62
Ansiedade, n (%) [†]	19,9	17,6	0,82
Agitação/agressão, n (%) [†]	9,8	5,9	0,55
Euforia, n (%) [‡]	1,3	5,9	0,18
Desinibição, n (%) [‡]	2,4	2,9	1
Irritabilidade, n (%) [†]	9,7	11,8	0,76
Apatia, n (%) [†]	10,8	11,8	1
Distúrbios motores, n (%) [‡]	3,1	5,9	0,61
Comportamentos noturnos, n (%) [†]	14,6	5,9	0,12
Mudanças de apetite, n (%) [†]	26,4	11,8	0,09

*teste t não pareado; [†]teste qui-quadrado; [‡]teste exato de Fisher

4.4. Análise de níveis de escolaridade entre raças

Através do teste ANOVA um fator verificamos que o nível de escolaridade de indivíduos asiáticos (7,5 anos, DP±4,3) foi maior do que em em caucasianos (5,2 anos, DP±4,2, p=0,005). O mesmo tipo de análise demonstrou que o nível de escolaridade de indivíduos asiáticos também foi maior quando comparado com o grupo negros+pardos (4,1 anos, DP±3,5, p<0,0001).

4.5. Investigação da associação de TDP-43 e raça e estágios de Braak: análises multivariadas

Investigamos se a associação entre TDP-43 e raça permaneceria significativa após as análises multivariadas com ajuste para escolaridade, idade, gênero e estágio de Braak. Essas análises mostraram que asiáticos ainda possuíam 3,5 vezes mais chance de exibir deposição anormal da proteína TDP-43, quando comparados à indivíduos caucasianos, mesmo após ajuste para todas essas variáveis (*odds ratio*=3,5, intervalo de confiança: 1,41-8,69, $p=0,007$, tabela 7).

Tabela 7 - Associação entre TDP-43 e raça (n=323).

Modelo	Bruto		Multivariada*	
	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p
Negros + Pardos	0,74 (0,29-1,95)	0,55	0,81 (0,31-2,16)	0,68
Asiáticos	3,72 (1,56-8,91)	0,003	3,50 (1,41-8,69)	0,007

OD=*odds ratio*; IC= intervalo de confiança; referência caucasianos; *Regressão logística com ajuste para gênero, idade, escolaridade e estágio de Braak.

Nas análises univariadas encontramos associação entre as inclusões de TDP-43 e estágios Braak $\geq$ III ($p=0,03$). No entanto, essa associação não foi significativa após a análise multivariada com ajuste para idade, gênero e escolaridade (Braak I-II: *odds ratio*=0,82, 95% intervalo de confiança: 0,33-2,05; Braak III: *odds ratio*=1,94, 95% intervalo de confiança: 0,63-5,98, valor de $p=0,28$).

4.6. Local de origem dos indivíduos asiáticos

As análises dos arquivos SVOC demonstraram que 66,7% dos idosos asiáticos estudados nasceram no Brasil, 27,7% no Japão e 5,6% na China (Figura 8A). Teste qui-quadrado demonstrou que a positividade para TDP-43 nos indivíduos asiáticos, ocorreu principalmente em indivíduos nascidos no Japão (n=4) e 20% na China (n=2, $p=0,02$, Figura 8B).

Figura 8 - *Local de origem dos idosos asiáticos estudados.* O gráfico em A mostra o percentual de indivíduos idosos nascidos no Brasil, China e Japão considerando a amostra total de asiáticos. Em B observa-se local de origem dos indivíduos asiáticos positivos para TDP-43.

4.7. Distribuição de inclusões de TDP-43 em faixas etárias pré-senis e senis

Verificamos também se existia a distribuição de inclusões de TDP-43 nas diferentes faixas etárias. Essas análises demonstraram que 17,6% dos casos que apresentaram positividade para TDP-43 estavam incluídos na faixa etária de 50 a 59 anos, 11,8% em 60 a 69 anos, 32,4% em 70 a 79 e 38,2% tinham mais de 80 anos (Figura 9). O total de 32,3% indivíduos foram positivos para TDP-43 tinham idade inferior a 65 anos. Teste qui-quadrado não demonstrou diferenças significantes entre acúmulo de TDP-43 e idade quando os grupos foram categorizados em faixas por década ($p=0,056$).

Figura 9 - *Distribuição dos achados de TDP-43 por faixa etária (n=323).*

4.8. Características neuropatológicas das alterações de TDP-43 na amostra estudada

A análise neuropatológica dos casos positivos para TDP-43 demonstrou que a região mais frequentemente acometida foi a amígdala. Dos 34 indivíduos estudados, 29 (85,3%) apresentaram alterações nessa região. Um total de 19 indivíduos (55,8%) apresentou alterações de TDP-43 na formação hipocampal e 6 nos giros temporal inferior ou médio (n=6, 17,6%). Analisamos também a presença das alterações de TDP-43 por sub-região da formação hipocampal. Essas análises demonstraram a seguinte ordem de prevalência dos achados de TDP-43: córtex entorrinal (n=13, 38,2%), giro denteado (n=12, 35,2%), subículo (n=8, 23,5%), CA1 (n=7, 20,5%) e o giros temporal inferior ou médio. A figura 10 mostra as inclusões de TDP-43 nessas regiões cerebrais.

Com relação às áreas adicionais analisadas, inclusões de TDP-43 foram raramente encontradas no giro do cíngulo (n= 2, 5,8%), no giro frontal superior ou no colículo superior (n=1, 2,9%, Figura 11).

Todos os tipos de alterações neuropatológicas de TDP-43, verificadas em casos de doença (ICNs, NDs, ICGs e IINs), foram encontradas na amostra estudada. Os tipos de inclusões mais frequentes foram ICNs que estavam presentes em 79,4% dos casos, seguido dos NDs em 58,8, e ICGs em 52,9% dos casos (Figura 12). IINs foram observadas em 5 casos. Adicionalmente, outro tipo de inclusão de TDP-43 foi verificada na amostra estudada, essas foram inclusões do tipo *threads*, encontradas em 5 casos (Figura 12D, setas vermelhas). Dois casos foram sugestivos de subtipos patológicos de DLFT-TDP. Um deles apresentou ICNs granulares sugestivas do subtipo B (Figura 12B) e o outro NDs longos sugestivos do subtipo C (Figura 12C).

Deposição anormal de TDP-43 também foi observada próximo às regiões de meninge pia-máter (Figura 13A) e na parede de vasos e em 11,7% dos casos (Figura 13B).

Na tabela 8 pode-se encontrar informações detalhadas sobre os achados de TDP-43 em cada caso.

Figura 10 - Regiões mais frequentemente afetadas pelo acúmulo de TDP-43 nos indivíduos cognitivamente normais estudados. Inclusões intracitoplasmáticas neuronais (ICNs) na amígdala (seta, A), inclusões intracitoplasmáticas gliais (seta, ICGs) no córtex entorinal (seta, B), ICNs na fascia denteada do hipocampo (seta, C), ICGs no subículo e CA1 (setas, D e E, respectivamente), ICNs (seta preta) e ICGs (seta vermelha) no temporal inferior (F). Escala: 20µm.

Figura 11 - *Inclusões de TDP-43 no giro frontal superior, no giro do cíngulo e no colículo inferior. Neuritos distróficos (NDs) e inclusões intracitoplasmáticas (ICNs) neuronais no giro frontal superior (A), ICNs granulares no giro do cíngulo (B) e NDs no colículo inferior (C). Escala: 20µm.*

Figura 12 - *Tipos de inclusão de TDP-43 encontradas nos indivíduos cognitivamente normais estudados. Inclusões intracitoplasmáticas neuronais (A e B) e neuritos distróficos (tipo longo) em C (seta). Setas pretas em B e D demonstram inclusões intracitoplasmáticas gliais. Setas vermelhas em D mostram inclusões pontuais denominadas threads. Escala: 20 μ m*

Figura 13 - *Inclusões de TDP-43 em regiões próximo à meninge pia-máter e na parede de vasos. Escalas A: 100µm; B: 20µm.*

Tabela 8 - Áreas encefálicas afetadas pelas inclusões anormais de TDP-43 em cada caso positivo (n=34).

caso	AMIG	CE	GD	SUB	CA1	GT	GC	GFS	CS
1	x	x	x	x	x	x			
2	x	x					x		
3	x	x							
4	x	x							
5	x								
6	x		x						
7	x								
8	x								
9	x	x	x	x	x				
10	x		x						
11	x								
12	x			x	x				
13	x								
14	x	x							
15	x	x				x			
16	x	x				x			
17	x	x	x	x	x	x	x	x	x
18	x								
19			x						
20		x							
21	x	x		x	x				
23	x	x	x						
24	x		x		x				
25	x	x	x	x					
26		x							
27	x	x	x	x	x	x			
28	x		x			x			
29	x	x		x					
30	x								
31	x								
32	x								
33	x								
33	x	x	x						
34	x								

X= região encefálica acometida por inclusões de TDP-43; AMIG: amígdala; CE: córtex entorrinal; GD:giro denteado; SUB: subículo; GT: giros temporais médio e inferior; GC: giro do cíngulo; GFS: giro frontal superior; Cl: colículo superior.

5. DISCUSSÃO

Nós investigamos a presença de depósitos anormais da proteína TDP-43 no encéfalo de indivíduos cognitivamente normais provenientes de uma coleção cuja base populacional apresenta alta miscigenação étnica. Os achados neuropatológicos de TDP-43 foram associados à raça asiática. A alta prevalência dos agregados de TDP-43 em asiáticos mostrou-se independente dos fatores gênero, idade, escolaridade e estadiamento de emaranhados neurofibrilares da DA (estágio de Braak). O total de 10,5% dos indivíduos cognitivamente normais estudados apresentaram acúmulo anormal da proteína TDP-43 no encéfalo. Além disso, verificamos uma associação entre os achados neuropatológicos de TDP-43 e o avanço da idade. A amígdala foi a região encefálica estudada mais frequentemente acometida. Os achados de TDP-43 nessa região foram verificados em 85,3% dos casos.

5.1. Alta prevalência do acúmulo anormal de TDP-43 na raça asiática

Os termos raça e etnia são geralmente conectados e sobrepõem-se com termos como cultura e isolamento geográfico. Eles possuem importâncias e utilizações distintas e se modificam de acordo com a evolução da ciência e genética epidemiológica. Uma publicação da *Nature Genetics* definiu raça como “um termo não científico vago, que se refere a pessoas relacionadas geneticamente e que compartilham certos aspectos físicos; distinção de um grupo étnico caracterizada por traços transmitidos para a prole; divisões maiores de tipos humanos, representando características físicas distintas; grupo de indivíduos que são mais ou menos isolados geneticamente ou culturalmente e compartilham um mesmo *pool* gênico e cujas frequências de alelos em alguns *locus*, diferem daqueles verificados em outras populações” (Editorial, 2000). Esse mesmo editorial definiu grupo étnico como, uma população de indivíduos organizados de acordo com uma origem cultural, nacionalidade ou tradições culturais em comum; um grupo social ou categoria de uma população que, em uma grande sociedade, é considerada um grupo a parte, e que quando reunido, apresentam laços comuns de uma raça, língua, nacionalidade ou cultura (Editorial, 2000). Nota-se portanto que a definição de

raça inclui características proeminentemente genéticas. Entretanto, ambos, raça e etnicidade, possuem relevância e servem de base importante para estudos de correlação genótipo-fenótipo (Cummings e Altman, 2005).

Dos trabalhos que analisaram a presença da proteína TDP-43 em indivíduos idosos normais, (Arnold et al., 2013; Geser et al., 2010; Nakashima-Yasuda et al., 2007; Wilson et al., 2011) somos o primeiro que verificou a presença de TDP-43 entre diferentes raças. Diferentemente de outros bancos de encéfalos, nossa coleção é composta por um grande número de indivíduos idosos cognitivamente normais provenientes de uma cidade, cuja base populacional apresenta características de alta diversidade étnica (Basto, 1998; Hall, 2005) e socioeconômica. Esse fato cria uma oportunidade única para investigar fases iniciais da doença, estudando indivíduos em fase pré-clínica ou latente de doenças neurodegenerativas (Grinberg et al., 2009a). Além de realizar estudos de correlação clinicopatológica em indivíduos com diferentes níveis de escolaridade (Farfel et al., 2013) e de diferentes raças (Schlesinger et al., 2013).

Um dos nossos estudos demonstrou que a DA inicia-se em núcleos do tronco cerebral e não no allocórtex como se pensava anteriormente (Grinberg et al., 2009a). Esses achados contribuíram para a revisão do critério de estadiamento patológico mais utilizado para a DA (Braak et al., 2011). Além disso, essas áreas no tronco cerebral podem ser importantes alvos de intervenção terapêutica, visto que podem anunciar o início e a propagação das alterações citoesqueléticas relacionadas à DA. Recentemente demonstramos também que poucos anos de escolaridade, alteram a relação entre os achados patológicos de DA e manifestação clínica da doença (Farfel et al., 2013). Isto é, foi verificado que poucos anos de escolaridade, quando comparados com o analfabetismo, são suficientes para proteger os indivíduos contra o declínio cognitivo, mesmo quando esses indivíduos apresentavam as lesões neuropatológicas características da DA no cérebro. Este fato tem grande relevância para países em desenvolvimento, onde a prevalência de analfabetismo em idosos é superior a 20% (IBGE, 2013). Outro estudo realizado com material do BEHGEEC verificou que indivíduos com

ancestralidade africana são mais resistentes à expressão clínica das placas amilóides, um dos sinais mais importantes da DA (Schlesinger et al., 2013). Essa proteção pode ser originada tanto de variantes genéticas, como de fatores ambientais ainda desconhecidos.

A população brasileira é derivada em sua maioria de escravos africanos e imigrantes europeus. No entanto, a população de São Paulo, possui um grande número de indivíduos japoneses, devido à imigração desse grupo de indivíduos desde 1900, compondo a maior comunidade japonesa fora do Japão (IBGE, 2010). Nossos dados mostraram que a positividade de TDP-43 nos indivíduos asiáticos ocorreu principalmente em indivíduos nascidos no Japão e na China. Isso indica que a miscigenação dos indivíduos asiáticos estudados é mínima.

Diversos fatores poderiam explicar a maior prevalência dos agregados de TDP-43 na raça asiática em nossa série de indivíduos cognitivamente normais. O fator escolaridade já foi demonstrado como importante protetor contra o desenvolvimento de demência, pelo menos em casos de DA (Bennett et al., 2003; Farfel et al., 2013). No entanto, apesar dos indivíduos asiáticos apresentarem maiores níveis de escolaridade do que os caucasianos, a associação entre acúmulo de TDP-43 e a étnica asiática manteve-se após ajustes para escolaridade.

Dessa maneira, outros aspectos culturais, como dieta ou condições ambientais relacionados à raça asiática poderiam funcionar como protetores contra o desenvolvimento da doença. No entanto, um estudo interessante que estimou a prevalência de demência entre japoneses que vivem no Japão e que imigraram para o Brasil antes da II Guerra Mundial, não verificou diferenças na prevalência total de demência ou de tipos de demência (DA e demência vascular) entre imigrantes (7,8%) (Meguro et al., 2001) e a população japonesa (8%) (Ishii et al., 1999). Esses dados vão contra a hipótese de que exista contribuição do ambiente (pelo menos em idosos) na prevalência de demência. Já um estudo com idosos japoneses demonstrou que alta ingestão de soja, vegetais, algas e leite, e a baixa ingestão de arroz, foi associada a um risco reduzido de desenvolvimento de demência nessa população (Ozawa et al.,

2013). Indicando que hábitos de vida como alimentação, poderiam funcionar como fatores protetores contra o desenvolvimento de demência. No entanto, um estudo demonstrou que esses japoneses podem apresentar acultramento de hábitos alimentares após imigração para o Brasil (Cardoso et al., 1997).

Tendo em vista a baixa miscigenação dos asiáticos da nossa amostra, características genéticas desses indivíduos, poderiam ter um papel protetor contra os efeitos deletérios do acúmulo da proteína TDP-43. Um estudo que comparou a incidência de ELA (TDP-43 proteinopatia) em diferentes grupos raciais, demonstrou menor incidência da doença em asiáticos, quando comparada com as taxas de incidência em caucasianos (Cronin et al., 2007). Além disso, mutação no gene C9orf72 é o tipo mais comum de mutação verificada no espectro DFLT-ELA em caucasianos (Dejesus-Hernandez et al., 2011; Gijssels et al., 2012). Curiosamente, esse tipo de mutação C9orf72 é geralmente rara em populações asiáticas (Ishiura et al., 2012; Jang et al., 2013; Konno et al., 2013; Majounie et al., 2012; Ogaki et al., 2012; Tsai et al., 2012; Zou et al., 2013), incluindo populações Japonesas (Ishiura et al., 2012; Konno et al., 2013; Ogaki et al., 2012) e Chinesas (Tsai et al., 2012; Zou et al., 2013).

É bem aceito pela comunidade médica que grupos raciais/étnicos diferem significativamente em termos de taxas de incidência e mortalidade em certos tipos de doenças. Por exemplo, negros americanos têm maior risco de desenvolver câncer de esôfago e estômago e mieloma múltiplo, enquanto que caucasianos americanos apresentam maior incidência de melanoma, leucemia e alguns tipos de linfomas (Perera, 1997). Além disso, existem casos de mutações mendelianas que levam a doenças primariamente em um único grupo racial. Exemplos disso são doenças hereditárias como hemocromatose que ocorre devido a um tipo de mutação homozigótica (em Cys282Tyr) que é rara em indianos e chineses, mas ocorre em 7,5% de suíços (Beckman e Beckman, 1997) e a anemia falciforme que é prevalente em indivíduos da raça africana (Chebloune et al., 1988).

Com relação às doenças neurodegenerativas (DNNs), o diagnóstico definitivo é diferente das outras doenças. Sendo realizado por exame cerebral *post-mortem* e então correlacionado com o histórico clínico do paciente durante

a vida. No entanto, tem ocorrido uma mudança no diagnóstico das doenças DNDs. Um ponto importante de mudança foi o diagnóstico da doença de Pick. Classicamente, o diagnóstico da doença de Pick era definido como um tipo de demência que possui características neuropatológicas de atrofia frontotemporal e inclusão de corpos argirofílicos no citoplasma de neurônios. Após a descoberta de informações genéticas relacionadas à doença, o termo demência frontotemporal ligada ao cromossomo 17 (DLFT-17) começou a ser empregado (Foster et al., 1997). O estudo de mutações no gene da proteína tau também revelou causas genéticas para DNDs (Spillantini et al., 1998). Atualmente, diversos tipos de mutações autossômicas dominantes, em diferentes genes (TARDBP, ANG, VCP, UBQLN2, OPTN, PGRN, C9orf72, ATXN2), já foram associados aos espectros de DLFT e ELA por TDP-43 (Baker et al., 2006; Cruts et al., 2006; Dejesus-Hernandez et al., 2011; Deng et al., 2011; Elden et al., 2010; Gijselinck et al., 2012; Greenway et al., 2006; Majounie et al., 2012; Maruyama et al., 2010; Rutherford et al., 2008; Watts et al., 2004). Critérios diagnósticos de acordo com fatores neuropatológicos apenas, têm mudado para inclusão de mutações genéticas ou de processos celulares relacionados. Parte dessa mudança de paradigma é a ideia de que um dado genótipo pode levar a um determinado tipo de manifestação clínica da doença. No entanto, atualmente é difícil determinar se um dado fenótipo, relacionado a descoberta de um gene específico, por exemplo, é similar entre grupos raciais e étnicos devido a falta de estudos clinicopatológicos em não-caucasianos. Essa falta de estudos comparativos entre raças tem nos levado a supor, de maneira possivelmente falha, que os fenótipos clínicos observados nas DNDs são similares em causa e efeito entre diferentes grupos raciais (Hardy et al., 2003). Dentro desse contexto, nossos dados são um alerta para a falta de estudos que analisem aspectos clinicopatológicos e genéticos relacionados a demências em populações de diferentes raças.

Atualmente, não há cura (Miller et al., 2012) ou droga com eficácia comprovada para o tratamento de DLFT e ELA (Fernandes et al., 2013). Prevenção da doença, retardo do início da doença, bem como tratamento em fases iniciais têm sido consideradas prioridades no cuidado das demências em geral (Shineman e Fillit, 2009). Terapias não-farmacológicas incluindo

mudanças no hábito de vida também têm sido sugeridas (Yaffe e Hoang, 2013). Terapia gênica através do silenciamento do C9orf72 tem sido sugerido para tratamento do espectro c9DLFT/ELA (Fernandes et al., 2013; Riboldi et al., 2014). Reconhecer a implicação da raça como fator de risco ou proteção para as DNDs teria grande importância para seu tratamento e prevenção. Isso porque, pacientes com fenótipos clínicos semelhantes, mas causas moleculares distintas, podem necessitar de diferentes tratamentos. Nesse contexto, identificar fatores protetores associados com raça, sejam eles hábitos de vida ou características genéticas, pode ser importante para o conhecimento de novos alvos terapêuticos para o tratamento de DLFT e ELA.

A separação de indivíduos por raça ou raça por autodeclaração é atualmente o critério adotado e utilizado para levantamentos sociodemográfico e até mesmo para estudos de correlação clinicopatológica. Em nosso estudo, os indivíduos foram categorizados de acordo com a declaração do familiar durante a entrevista clínica. No entanto, linhas de pensamento têm sugerido que a categorização dos indivíduos de acordo com raça ou etnia autodeclarada não teria relevância biológica (Schwartz, 2001). Contudo, os diversos estudos publicados antes da era genômica têm documentado diferenças biológicas importantes, como susceptibilidade ou história natural de doença crônica, a partir de dados de raça autodeclarada. Dentro desse contexto, é difícil imaginar que tais diferenças não possuam um significado biológico. Além disso, apesar das limitações, a separação de indivíduos por raça autodeclarada é o único marcador que pode orientar estudos de ancestralidade (Cardena et al., 2013). O termo ancestralidade, refere-se à raça/etnicidade dos ancestrais de um indivíduo, independente de sua afiliação atual. Para determinação de ancestralidade, análises de polimorfismos de DNA têm sido sugeridas para categorizar indivíduos pertencentes a diferentes grupos raciais (Bowcock et al., 1991; Bowcock et al., 1994; Calafell et al., 1998; Cavalli-Sforza et al., 1988). De maneira interessante, o estudo do nosso grupo que utilizou determinação genética de ancestralidade por *Ancestry-informative-markers* (AIMs) em uma pequena fração da amostra de asiáticos autodeclarados (n=6), demonstrou que

100% desses sujeitos foram também classificados como asiáticos após essas análises (Schlesinger et al., 2013).

5.2. Associação entre inclusões de TDP-43 e idade

Dentre os achados importantes publicados pelos trabalhos que analisaram a presença da proteína TDP-43 em indivíduos idosos normais (Arnold et al., 2013; Geser et al., 2010; Nakashima-Yasuda et al., 2007; Wilson et al., 2011) estão: (1) a associação entre inclusões de TDP-43 e idade (Geser et al., 2010) de acordo com os nossos achados, e (2) a associação entre acúmulo de TDP-43 e doença por grãos argirofílicos (DGA) (Arnold et al., 2013).

Verificamos uma prevalência de 10,5% dos agregados anormais de TDP-43 nos indivíduos cognitivamente normais estudados. A presença de outros agregados proteicos anormais no envelhecimento cognitivamente normal já foi reportada anteriormente. Placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares estão presentes em indivíduos cognitivamente normais (Bouras et al., 1994; Braak e Braak, 1997; Caselli et al., 2010; Crystal et al., 1993; Davies et al., 1988; Dickson et al., 1992; Price et al., 2009; Schmitt et al., 2000; Villemagne et al., 2008; Wolf et al., 1999). Corpúsculos de Lewy já foram detectados em aproximadamente 10 a 25% de indivíduos clinicamente saudáveis acima da idade de 60 anos e essa prevalência aumenta com idade (Adler et al., 2010; Gibb, 1986; Gibb e Lees, 1988; Klos et al., 2006). A DGA caracterizada por depósito de proteína tau (Spillantini et al., 1999) também está presente em uma frequência de 16 a 22% em idosos normais (Adler et al., 2010; Gibb, 1986; Gibb e Lees, 1988; Josephs et al., 2008c; Klos et al., 2006; Sabbagh et al., 2009). O acúmulo de proteínas anormais no envelhecimento indica que o sistema de processamento de proteínas (como o sistema proteassoma ubiquitina) no cérebro de indivíduos idosos, pode não ser capaz de catalisar a quantidade de proteínas malformadas (Kovacs et al., 2013).

A prevalência dos achados neuropatológicos de TDP-43 em idosos cognitivamente normais observada nos estudos previamente publicados (Arnold et al., 2013; Geser et al., 2010; Wilson et al., 2011) apresentou uma

alta variação (3% a 36,6%). Dentre esses estudos, apenas um deles verificou associação entre inclusões de TDP-43 e idade, assim como os nossos achados (Geser et al., 2010). Isso pode ter ocorrido devido à diferenças no desenho de estudo utilizado, principalmente com relação as características das amostras de cada um desses estudos. Wilson et al. (2011) estudaram a presença dos agregados de TDP-43 em 63 indivíduos idosos cognitivamente normais e encontrou 3% de prevalência desses achados em sua amostra. A faixa de idade dos indivíduos desse estudo foi de 23 a 94 anos com mediana de 71, desvio padrão dessa variável não foi divulgado pelos autores. Apenas dois indivíduos apresentaram inclusões de TDP-43 nesse estudo e ambos pertenciam à faixa etária de 80 a 89 anos. Geser et al. (2011), por sua vez verificaram a prevalência de TDP-43 em 60 idosos cognitivamente normais. A prevalência de das inclusões de TDP-43 nesse estudo foi semelhante a nossa (16%), além disso, eles verificaram associação dos achados de TDP-43 e idade. No entanto, não foram verificados casos positivos em indivíduos com idade inferior a 65 anos (Geser et al., 2011).

Desses trabalhos, o que possui maior n amostral é o estudo de Arnold et al. (2013). Os autores encontraram a presença de TDP-43 fosforilarada em 36,4% dos 110 indivíduos idosos normais estudados. No entanto, apenas indivíduos acima de 70 anos foram avaliados. Nós incluímos sujeitos de idade entre 50 e 90 anos a fim de abranger um amplo espectro de idade. Além disso, selecionamos número heterogêneo de indivíduos em diferentes grupos etários. A inclusão de indivíduos a partir de 50 anos é importante para investigar os agregados de TDP-43 em faixas pré-senis, já que as DFTs são tão prevalentes quanto as DA nessas faixas etárias (Ratnavalli et al., 2002). Diferentes dos outros trabalhos, nós possuímos ampla variação de idade, permitindo-nos avaliar os achados de TDP-43 em diferentes faixas etárias. Além disso, verificamos a presença desses agregados em indivíduos com menos de 65 anos ($n=11$), o que indica que estamos estudando indivíduos em fases pré-clínicas ou latentes da doença e não apenas agregados incidentais decorrentes do avanço da idade, verificados pelos outros trabalhos com TDP-43 com outras proteínas malformadas.

O trabalho de Arnold et al. (2013) também mostrou associação entre acúmulo de TDP-43 e a presença de DGA em indivíduos cognitivamente normais. Em nosso estudo, análises univariadas demonstraram associação entre inclusões de TDP-43 e estágios de Braak ≥ 3 , que indica a distribuição de emaranhados neurofibrilares (formados por agregados da proteína tau). A prevalência de TDP-43 na DA já foi reportada em até 75% (Amador-Ortiz et al., 2007). Um trabalho sugere inclusive o estadiamento dos achados patológicos de TDP-43 na DA (Josephs et al., 2014). A associação de TDP-43 e emaranhados neurofibrilares foi também verificada em uma amostra de 332 idosos que foram submetidos à avaliações clínicas ao longo da vida (Kovacs et al., 2013). No entanto, indivíduos cognitivamente normais e indivíduos com déficit cognitivo não foram analisados separadamente nesse estudo. Essas evidências sugerem que os mecanismos patogênicos de diversas inclusões poderiam interagir de forma sinérgica, resultando na exacerbação do processo neurodegenerativo (Taylor et al., 2002). No entanto, não existem estudos moleculares que demonstrem se o acúmulo de TDP-43 leva ao acúmulo anormal da proteína tau, ou o contrário. Além disso, nossas análises multivariadas demonstraram que a associação entre o acúmulo de TDP-43 e estágio de Braak não permaneceu significativa após ajuste para idade. Ademais, o estudo de Arnold et al (2013) não deixa claro se a associação entre os achados de TDP-43 e DGA ocorre de maneira independente da idade, uma vez que os dados não foram ajustados para idade nesse estudo. Também não está claro qual seria a relevância clínica dos achados de TDP-43. Apesar de um estudo demonstrar a associação independente de TDP-43 com a aceleração do declínio cognitivo e alteração de memória episódica (Wilson et al., 2013) a significância clínica do impacto do acúmulo de TDP-43 em outras DNDs ainda não é bem compreendido. Outra questão que continua não respondida é o qual seria o ponto de virada para que essas proteínas se tornem patológicas, quais fatores que levariam a expressão clínica dessas proteínas malformada no cérebro durante o envelhecimento.

Entender o espectro de depósitos proteicos no cérebro de indivíduos idosos dementados e não-dementados é importante, pois modificações dessas

proteínas podem ser detectadas em fluídos corporais, podendo ser utilizadas como biomarcadores. Esse dados seriam complementares às técnicas de neuroimagem e análises genéticas, para a obtenção de um perfil diagnóstico altamente personalizado, o que ainda não existe. Além disso, definir grupos de pacientes de acordo com o perfil de modificação bioquímica dessas proteínas durante o envelhecimento normal e patológico, pode ter um importante papel para prever prognóstico e monitorar eficácia de abordagens terapêuticas (Kovacs et al., 2010).

5.3. Características neuropatológicas dos achados de TDP-43 na amostra estudada

Os estudos que verificaram a presença de TDP-43 em indivíduos cognitivamente normais, também verificaram a amígdala como a região cerebral mais frequentemente acometida (Arnold et al., 2013; Geser et al., 2010). Além disso, outro trabalho que reportou a presença de TDP-43 no envelhecimento (cognitivamente normal e com déficit cognitivo) também verificou maior prevalência do acúmulo de TDP-43 nessa região cerebral (Kovacs et al., 2013). Esses dados sugerem que a amígdala seria o local mais vulnerável às alterações patológicas de TDP-43. Trabalhos anteriores já haviam sugerido o sistema límbico como sítio inicial de acometimento dos achados de TDP-43 em casos de doença, iniciando-se na amígdala e atingindo córtex de associação superiores em fases tardias (Arai et al., 2009; Hu et al., 2008). De acordo com essa hipótese, 85% dos casos positivos para TDP-43 em nossa amostra mostraram comprometimento da amígdala e 55,8% do hipocampo. Os giros temporal médio, inferior e frontal superior estavam raramente afetados.

No entanto, existem contraversas e outra teoria propõe que a patologia por TDP-43 se caracterizaria como uma doença multissistêmica (Geser et al., 2009). Em nossa amostra, verificamos a seguinte ordem de prevalência de acúmulo de TDP-43 nas regiões cerebrais estudadas: amígdala, córtex entorrinal, giro denteado, subículo, CA1 e giros temporal inferior/médio. Entretanto, essa sequência não foi observada em todos os casos. Esses dados

corroboram com a teoria multissistêmica das DLFTs. Devido a isso, acreditamos que ambas as teorias estariam corretas e se complementariam.

Nos casos de doença por DLFT, nossa hipótese é que o local de acometimento das alterações proteicas, sejam quaisquer uma delas (TDP-43, tau, FUS ou ubiquitina) é o que determinaria o tipo de manifestação clínica. Devido a isso, é verificada a superposição de sintomas e agregados proteicos nas DLFTs (Josephs et al., 2008b; Pan e Chen, 2013; Rabinovici e Miller, 2010; Roeber et al., 2008). A questão que permanece não compreendida é quais fatores determinariam a região que seria afetada posteriormente durante a evolução da doença, caracterizando o quadro clínico observado. Uma vez que já foi demonstrado que o estadiamento de TDP-43 em DA, difere por exemplo, da progressão verificada dos achados de TDP-43 em ELA (Brettschneider et al., 2013). Um dos objetivos desse trabalho era o estadiamento de TDP-43 para DLFT, assim como o estadiamento de Braak para os ENF da DA (Braak e Braak, 1991). No entanto, devido a baixa prevalência das inclusões de TDP-43 em nossos casos, acreditamos que para reconhecer estágios de acúmulo de TDP-43 na DLFT é necessário um estudo semelhante ao nosso, mas que incluía um número ainda maior de casos e compreendia não apenas indivíduos cognitivamente normais, mas também com déficit cognitivo, pertencentes às diferentes variantes clínicas das DLFTs. Até o momento, não existem estudos que apresentaram esse desenho.

Com relação ao papel da amígdala nas DLFTs, estudos de imagem mostram atrofia grave dessa região cerebral em pacientes com esse tipo de doença, distinguindo-se inclusive dos padrões de atrofia em casos de DA (Barnes et al., 2006; Boccardi et al., 2005; Chan et al., 2001; Whitwell et al., 2005). Modelos animais e estudos com humanos já demonstraram que danos na amígdala estão associados a proeminentes problemas comportamentais (Cummings e Duchon, 1981; Tranel e Hyman, 1990). Ambos os subnúcleos da amígdala, lateral e basal, projetam *outputs* para o córtex pré-frontal, lobo temporal medial e para os gânglios basais (Petrovich et al., 2001). Essa rede entre amígdala e córtices de associação superiores ou gânglios basais, tem sido sugerida como intermediadora entre estados emocionais primitivos e a

maquinaria neocortical relacionada a direcionamentos comportamentais mais complexos (Kringelbach e Rolls, 2004). Todas essas regiões córtex pré-frontal, lobo temporal medial e gânglios basais apresentam-se gravemente acometidos em fases mais tardias dos subtipos de DLFT (Cairns et al., 2007b). Além de estarem diretamente relacionadas à fisiopatologia da doença (Broe et al., 2003; McKhann et al., 2001a). Apesar desses estudos evidenciarem o papel da amígdala na fisiopatologia da doença, o acometimento dessa região explicaria a manifestação das variantes comportamental e semântica de DFT, mas não de outros fenótipos clínicos como afasia primária progressiva não-fluente e DFT com alterações motoras. Além disso, apesar do acometimento preferencial da amígdala (85% da amostra), não encontramos associações entre inclusões de TDP-43 e sintomas neuropsiquiátricos. Por outro lado, a amígdala pode ser foco para retardar ou até mesmo prevenir manifestações clínicas relacionadas aos agregados anormais de TDP-43. Proteínas *heat shock*, por exemplo, possuem papel importante no processamento e controle de qualidade estrutural de proteínas (Adachi et al., 2009). Arimoclomol, que é um co-indutor de proteínas *heat shock* foi capaz de provocar um retardo na progressão de ELA em modelo de camundongos (Kieran et al., 2004). Já foi mostrado que o sistema de processamento de proteínas malformadas pode funcionar de maneira diferente em cada região cerebral (Adori et al., 2005), o que tornaria algumas regiões cerebrais mais susceptíveis do que outras ao acúmulo de proteínas específicas. O foco de estudos futuros seria compreender como ocorre o sistema de processamento de proteínas na amígdala, para então descobrir estratégias terapêuticas personalizadas com foco nessa região.

Assim como os outros trabalhos publicados na área (Arnold et al., 2013; Geser et al., 2010; Wilson et al., 2011), encontramos todos os tipos de inclusão de TDP-43 verificadas nos casos de DLFT-TDP. No entanto, um desses trabalhos classificou a patologia por TDP-43 em idosos cognitivamente normais em 4 subgrupos de acordo com o tipo de patologia encontrada: (1) patologia difusa; (2) patologia focal; (3) patologia perivascular e; (4) patologia subpial e subependimal (Geser et al., 2010). Os nossos casos também apresentaram esses padrões de alteração, pois alguns casos apresentaram alterações

restritas à determinadas regiões, caracterizando um tipo de patologia focal. Enquanto outros apresentaram alterações em diversas áreas cerebrais, caracterizando patologia difusa. Além disso, também verificamos achados de TDP-43 em vasos e pia-máter, classificando os tipos 3 e 4 encontrados no estudo de Geser et al. (2011). No entanto, até o momento não foram investigadas associações clinicopatológicas desses achados.

O processo molecular de neurodegeneração ligado à proteína TDP-43 ainda é pouco compreendido. Recentemente, modelos animais e celulares de perda de função verificaram que a TDP-43 tem papel importante no fluxo neuronal anterógrado (Alami et al., 2014). Uma hipótese a partir dos nossos dados e tendo como base o que é sabido na literatura, seria que a proteína TDP-43 se tornaria patológica, ou por mutação ou por modificações pós-traducionais. O acúmulo anormal de TDP-43 ocorreria inicialmente no citoplasma de neurônios (observada em 79,4% nos nossos casos) de regiões específicas mais susceptíveis ao acúmulo dessa proteína, em nosso caso a amígdala. O domínio priônico de TDP-43 recrutaria os monômeros endógenos de TDP-43 e induziria uma conformação anormal à essas proteínas. Isso poderia então funcionar como sementes que por sua vez, seriam então liberadas no ambiente adjacente à célula acometida, bem como serem transportados por axônios via sinapses de célula para célula (Nonaka et al., 2013). De acordo com esse dado, inclusões de TDP-43 em forma de neuritos distróficos foram observados em 58,8% da nossa amostra. Isso proporcionaria então o acometimento de outras regiões encefálicas no curso da doença.

5.4. Limitações do estudo

A falta de informações clínicas coletadas durante a vida, incluindo avaliação cognitiva e neuropsicológica, é uma das limitações desse estudo. Além disso, a nossa classificação de raça foi realizada através da declaração do informante. Sabemos que determinação genética de ancestralidade pode contribuir para a separação de indivíduos de diferentes grupos raciais. Ademais, apesar do nosso n amostral total ($n=323$) ser relativamente alto quando comparado aos outros estudos na área, nossa amostra de indivíduos

positivos para TDP-43 era restrita (n=34). Isso foi um fator limitante tanto para a realização de outras análises estatísticas, bem como para determinação de fases da doença nas áreas encefálicas estudadas através de análise dos agregados de TDP-43 em cada caso. Por fim, a heterogeneidade de amostragem das áreas encefálicas em cada caso, não permitiu análise mais aprofundada do acometimento de populações neuronais restritas, como camadas do córtex ou subnúcleos da amígdala.

6. CONCLUSÕES

Depósitos anormais da proteína TDP-43, na sua forma hiperfosforilada, estão presentes no envelhecimento humano cognitivamente normal, acometendo 10,5% dos indivíduos de meia-idade e idosos estudados.

A amígdala é a região encefálica analisada mais frequentemente acometida pelas inclusões anormais da TDP-43. Isso indica que essa região pode ser a mais vulnerável a alterações por TDP-43 e deve ser investigada se o mesmo ocorre em casos que evoluem para doença.

A prevalência de inclusões TDP-43 positivas é maior em indivíduos da raça asiática. Esses dados sugerem que o conhecimento adquirido sobre características neuropatológicas em determinada raça não pode ser generalizado para outra.

REFERÊNCIAS

- Adachi H, Katsuno M, Waza M, Minamiyama M, Tanaka F, Sobue G. Heat shock proteins in neurodegenerative diseases: pathogenic roles and therapeutic implications. *Int J Hyperthermia*. 2009;25(8):647-54.
- Adler CH, Connor DJ, Hentz JG, Sabbagh MN, Caviness JN, Shill HA, et al. Incidental Lewy body disease: clinical comparison to a control cohort. *Mov Disord*. 2010;25(5):642-6.
- Adori C, Kovacs GG, Low P, Molnar K, Gorbea C, Feller E, et al. The ubiquitin-proteasome system in Creutzfeldt-Jakob and Alzheimer disease: intracellular redistribution of components correlates with neuronal vulnerability. *Neurobiol Dis*. 2005;19(3):427-35.
- Afanas'ev I. Reactive oxygen species signaling in cancer: comparison with aging. *Aging Dis*. 2011;2(3):219-30.
- Alami NH, Smith RB, Carrasco MA, Williams LA, Winborn CS, Han SS, et al. Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations. *Neuron*. 2014;81(3):536-43.
- Alzheimer A. A contribution concerning the pathological anatomy of mental disturbances in old age, 1899. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 1991;5(2):69-70.
- Amador-Ortiz C, Lin WL, Ahmed Z, Personett D, Davies P, Duara R, et al. TDP-43 immunoreactivity in hippocampal sclerosis and Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 2007;61(5):435-45.
- Arai T, Mackenzie IR, Hasegawa M, Nonaka T, Niizato K, Tsuchiya K, et al. Phosphorylated TDP-43 in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Acta neuropathologica*. 2009;117(2):125-36.
- Arnold SJ, Dugger BN, Beach TG. TDP-43 deposition in prospectively followed, cognitively normal elderly individuals: correlation with argyrophilic grains but not other concomitant pathologies. *Acta neuropathologica*. 2013;126(1):51-7.
- Ash PE, Zhang YJ, Roberts CM, Saldi T, Hutter H, Buratti E, et al. Neurotoxic effects of TDP-43 overexpression in *C. elegans*. *Hum Mol Genet*. 2010;19(16):3206-18.
- Ayala YM, Misteli T, Baralle FE. TDP-43 regulates retinoblastoma protein phosphorylation through the repression of cyclin-dependent kinase 6 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(10):3785-9.
- Ayala YM, Pantano S, D'Ambrogio A, Buratti E, Brindisi A, Marchetti C, et al. Human, *Drosophila*, and *C.elegans* TDP43: nucleic acid binding

- properties and splicing regulatory function. *J Mol Biol.* 2005;348(3):575-88.
- Baer W, Campino AC, Cavalcante T. Condições e política de saúde no Brasil: uma avaliação das últimas décadas. *Economia Aplicada.* 2000;4(4):763-85.
- 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;442(7105):916-9.
- Barnes J, Whitwell JL, Frost C, Josephs KA, Rossor M, Fox NC. Measurements of the amygdala and hippocampus in pathologically confirmed Alzheimer disease and frontotemporal lobar degeneration. *Arch Neurol.* 2006;63(10):1434-9.
- Basto F. Síntese da História da Imigração no Brasil. 2 ed. Rio de Janeiro. Brasil.1998.
- Beach TG, Monsell SE, Phillips LE, Kukull W. Accuracy of the clinical diagnosis of Alzheimer disease at National Institute on Aging Alzheimer Disease Centers, 2005-2010. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012;71(4):266-73.
- Beckman LE, Beckman L. [Hereditary hemochromatosis. Genetic findings result in new therapeutic possibilities]. *Lakartidningen.* 1997;94(44):3961-2.
- Beltrão KI, Camarano AA, Kanso S. Dinâmica populacional brasileira na do século XX. *Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA)* 2004;1034.
- 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.
- Bennett DA, Wilson RS, Schneider JA, Evans DA, Mendes de Leon CF, Arnold SE, et al. Education modifies the relation of AD pathology to level of cognitive function in older persons. *Neurology.* 2003;60(12):1909-15.
- Berg L, McKeel DW, Jr., Miller JP, Storandt M, Rubin EH, Morris JC, et al. Clinicopathologic studies in cognitively healthy aging and Alzheimer's disease: relation of histologic markers to dementia severity, age, sex, and apolipoprotein E genotype. *Arch Neurol.* 1998;55(3):326-35.
- Bigio EH. Making the diagnosis of frontotemporal lobar degeneration. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137(3):314-25.
- Bigio EH, Weintraub S, Rademakers R, Baker M, Ahmadian SS, Rademaker A, et al. Frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 proteinopathy and chromosome 9p repeat expansion in C9ORF72: clinicopathologic correlation. *Neuropathology.* 2013;33(2):122-33.

- Bjorksten J, Tenhu H. The crosslinking theory of aging--added evidence. *Exp Gerontol*. 1990;25(2):91-5.
- Blach-Olszewska Z, Leszek J. Mechanisms of over-activated innate immune system regulation in autoimmune and neurodegenerative disorders. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2007;3(3):365-72.
- Boccardi M, Sabbatoli F, Laakso MP, Testa C, Rossi R, Beltramello A, et al. Frontotemporal dementia as a neural system disease. *Neurobiol Aging*. 2005;26(1):37-44.
- Boeve BF. The multiple phenotypes of corticobasal syndrome and corticobasal degeneration: implications for further study. *J Mol Neurosci*. 2011;45(3):350-3.
- Bolognesi B, Kumita JR, Barros TP, Esbjorner EK, Luheshi LM, Crowther DC, et al. ANS binding reveals common features of cytotoxic amyloid species. *ACS Chem Biol*. 2010;5(8):735-40.
- Bouras C, Hof PR, Giannakopoulos P, Michel JP, Morrison JH. Regional distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex of elderly patients: a quantitative evaluation of a one-year autopsy population from a geriatric hospital. *Cerebral cortex*. 1994;4(2):138-50.
- Bowcock AM, Kidd JR, Mountain JL, Hebert JM, Carotenuto L, Kidd KK, et al. Drift, admixture, and selection in human evolution: a study with DNA polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(3):839-43.
- Bowcock AM, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minch E, Kidd JR, Cavalli-Sforza LL. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*. 1994;368(6470):455-7.
- Braak H, Braak E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica*. 1991;82(4):239-59.
- Braak H, Braak E. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol Aging*. 1997;18(4):351-7.
- Braak H, Del Tredici K. Alzheimer's disease: intraneuronal alterations precede insoluble amyloid-beta formation. *Neurobiol Aging*. 2004;25(6):713-8; discussion 43-6.
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003;24(2):197-211.
- Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H, Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res*. 2004;318(1):121-34.

- 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;70(11):960-9.
- Brettschneider J, Del Tredici K, Toledo JB, Robinson JL, Irwin DJ, Grossman M, et al. Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2013;74(1):20-38.
- Broe M, Hodges JR, Schofield E, Shepherd CE, Kril JJ, Halliday GM. Staging disease severity in pathologically confirmed cases of frontotemporal dementia. *Neurology*. 2003;60(6):1005-11.
- Brun A. Frontal lobe degeneration of non-Alzheimer type. I. Neuropathology. *Arch Gerontol Geriatr*. 1987;6(3):193-208.
- Brys K, Vanfleteren JR, Braeckman BP. Testing the rate-of-living/oxidative damage theory of aging in the nematode model *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol*. 2007;42(9):845-51.
- Budini M, Baralle FE, Buratti E. Targeting TDP-43 in neurodegenerative diseases. *Expert Opin Ther Targets*. 2014;18(6):617-32.
- Buratti E, Baralle FE. Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease. *Front Biosci*. 2008;13:867-78.
- Buratti E, Baralle FE. The multiple roles of TDP-43 in pre-mRNA processing and gene expression regulation. *RNA Biol*. 2010;7(4):420-9.
- Buratti E, Baralle M, Baralle FE. Defective splicing, disease and therapy: searching for master checkpoints in exon definition. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(12):3494-510.
- Buratti E, Brindisi A, Giombi M, Tisminetzky S, Ayala YM, Baralle FE. TDP-43 binds heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B through its C-terminal tail: an important region for the inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 splicing. *J Biol Chem*. 2005;280(45):37572-84.
- Buratti E, Brindisi A, Pagani F, Baralle FE. Nuclear factor TDP-43 binds to the polymorphic TG repeats in CFTR intron 8 and causes skipping of exon 9: a functional link with disease penetrance. *Am J Hum Genet*. 2004;74(6):1322-5.
- Burns A, Iliffe S. Alzheimer's disease. *Bmj*. 2009;338:b158.
- Cairns NJ, Bigio EH, Mackenzie IR, Neumann M, Lee VM, Hatanpaa KJ, et al. Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. *Acta neuropathologica*. 2007a;114(1):5-22.

- Cairns NJ, Neumann M, Bigio EH, Holm IE, Troost D, Hatanpaa KJ, et al. TDP-43 in familial and sporadic frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin inclusions. *Am J Pathol*. 2007b;171(1):227-40.
- Calafell F, Shuster A, Speed WC, Kidd JR, Kidd KK. Short tandem repeat polymorphism evolution in humans. *Eur J Hum Genet*. 1998;6(1):38-49.
- Camarano AA. Envelhecimento, condições de vida e política previdenciária. Como ficam as mulheres? *Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA) Texto para discussão*. 1999;883.
- Cappellano G, Carecchio M, Fleetwood T, Magistrelli L, Cantello R, Dianzani U, et al. Immunity and inflammation in neurodegenerative diseases. *Am J Neurodegener Dis*. 2013;2(2):89-107.
- Cardena MM, Ribeiro-Dos-Santos A, Santos S, Mansur AJ, Pereira AC, Fridman C. Assessment of the relationship between self-declared ethnicity, mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in Brazilian individuals. *PLoS One*. 2013;8(4):e62005.
- Cardoso MA, Hamada GS, de Souza JM, Tsugane S, Tokudome S. Dietary patterns in Japanese migrants to southeastern Brazil and their descendants. *J Epidemiol*. 1997;7(4):198-204.
- Caselli RJ, Walker D, Sue L, Sabbagh M, Beach T. Amyloid load in nondemented brains correlates with APOE e4. *Neurosci Lett*. 2010;473(3):168-71.
- Cavalli-Sforza LL, Piazza A, Menozzi P, Mountain J. Reconstruction of human evolution: bringing together genetic, archaeological, and linguistic data. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(16):6002-6.
- Chaimowicz F. [Health of Brazilian elderly just before of the 21st century: current problems, forecasts and alternatives]. *Rev Saude Publica*. 1997;31(2):184-200.
- Chan D, Fox NC, Scahill RI, Crum WR, Whitwell JL, Leschziner G, et al. Patterns of temporal lobe atrophy in semantic dementia and Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 2001;49(4):433-42.
- Chare L, Hodges JR, Leyton CE, McGinley C, Tan RH, Kril JJ, et al. New criteria for frontotemporal dementia syndromes: clinical and pathological diagnostic implications. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014;85(8):865-70.
- Chebloune Y, Pagnier J, Trabuchet G, Faure C, Verdier G, Labie D, et al. Structural analysis of the 5' flanking region of the beta-globin gene in African sickle cell anemia patients: further evidence for three origins of the sickle cell mutation in Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(12):4431-5.

- Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem.* 2006;75:333-66.
- Christensen K, Thinggaard M, Oksuzyan A, Steenstrup T, Andersen-Ranberg K, Jeune B, et al. Physical and cognitive functioning of people older than 90 years: a comparison of two Danish cohorts born 10 years apart. *Lancet.* 2013;382(9903):1507-13.
- Colombrita C, Zennaro E, Fallini C, Weber M, Sommacal A, Buratti E, et al. TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult. *J Neurochem.* 2009;111(4):1051-61.
- Comfort A. The biology of senescence. 3 ed. ed. Paul R, editor: Elsevier; 1979.
- Cornelius CE, 3rd. Bone. A site of metastatic basal cell carcinoma. *Arch Surg.* 1972;104(6):848-50.
- Crews DE. Senescence, aging, and disease. *J Physiol Anthropol.* 2007;26(3):365-72.
- Cronin S, Hardiman O, Traynor BJ. Ethnic variation in the incidence of ALS: a systematic review. *Neurology.* 2007;68(13):1002-7.
- Cruts M, Gijssels I, van der Zee J, Engelborghs S, Wils H, Pirici D, et al. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature.* 2006;442(7105):920-4.
- Crystal HA, Dickson DW, Sliwinski MJ, Lipton RB, Grober E, Marks-Nelson H, et al. Pathological markers associated with normal aging and dementia in the elderly. *Ann Neurol.* 1993;34(4):566-73.
- Cummings JL, Altman J. Genotype, proteotype, phenotype relationships in neurodegenerative diseases. Highlights from the 21st Ipsen Foundation Alzheimer's Disease Symposium, September 13, 2004, Paris, France. *Rev Neurol Dis.* 2005;2(2):80-4.
- Cummings JL, Duchon LW. Kluver-Bucy syndrome in Pick disease: clinical and pathologic correlations. *Neurology.* 1981;31(11):1415-22.
- Custodio N, Herrera-Perez E, Lira D, Montesinos R, Bendezu L. Prevalence of frontotemporal dementia in community-based studies in Latin America. *Dement Neuropsychol.* 2013;7(1):27-32.
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology.* 1999;122 (Pt 8):1437-48.
- Davidovic M, Sevo G, Svorcan P, Milosevic DP, Despotovic N, Erceg P. Old age as a privilege of the "selfish ones". *Aging Dis.* 2010;1(2):139-46.

- Davidson Y, Kelley T, Mackenzie IR, Pickering-Brown S, Du Plessis D, Neary D, et al. Ubiquitinated pathological lesions in frontotemporal lobar degeneration contain the TAR DNA-binding protein, TDP-43. *Acta neuropathologica*. 2007;113(5):521-33.
- Davies L, Wolska B, Hilbich C, Multhaup G, Martins R, Simms G, et al. A4 amyloid protein deposition and the diagnosis of Alzheimer's disease: prevalence in aged brains determined by immunocytochemistry compared with conventional neuropathologic techniques. *Neurology*. 1988;38(11):1688-93.
- 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.
- Deng HX, Chen W, Hong ST, Boycott KM, Gorrie GH, Siddique N, et al. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature*. 2011;477(7363):211-5.
- Deramecourt V, Lebert F, Debachy B, Mackowiak-Cordoliani MA, Bombois S, Kerdraon O, et al. Prediction of pathology in primary progressive language and speech disorders. *Neurology*. 2010;74(1):42-9.
- Dewey CM, Cenik B, Sephton CF, Dries DR, Mayer P, 3rd, Good SK, et al. TDP-43 is directed to stress granules by sorbitol, a novel physiological osmotic and oxidative stressor. *Mol Cell Biol*. 2011;31(5):1098-108.
- Dickson DW, Crystal HA, Mattiace LA, Masur DM, Blau AD, Davies P, et al. Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging*. 1992;13(1):179-89.
- Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta neuropathologica*. 2009;118(1):5-36.
- Editorial. Census, race and science. *Nat Genet*. 2000;24(2):97-8.
- Elden AC, Kim HJ, Hart MP, Chen-Plotkin AS, Johnson BS, Fang X, et al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature*. 2010;466(7310):1069-75.
- Farfel JM, Nitrini R, Suemoto CK, Grinberg LT, Ferretti RE, Leite RE, et al. Very low levels of education and cognitive reserve: a clinicopathologic study. *Neurology*. 2013;81(7):650-7.
- Fernandes SA, Douglas AG, Varela MA, Wood MJ, Aoki Y. Oligonucleotide-Based Therapy for FTD/ALS Caused by the C9orf72 Repeat Expansion: A Perspective. *J Nucleic Acids*. 2013;2013:208245.

- Ferretti REL, Damin AE, Bruck SMD, Morillo LS, Perroco TR, Campora F, et al. Post-mortem diagnosis of dementia by informant interview. *Dementia and neuropsychologia*. 2010a;in press.
- Ferretti REL, Damin AE, Bruck SMD, Morillo LS, Perroco TR, Campora F, et al. Post-mortem diagnosis of dementia by informant interview. *Dementia and neuropsychologia*. 2010b;in press.
- Fiesel FC, Voigt A, Weber SS, Van den Haute C, Waldenmaier A, Gorner K, et al. Knockdown of transactive response DNA-binding protein (TDP-43) downregulates histone deacetylase 6. *EMBO J*. 2009;29(1):209-21.
- Fiesel FC, Voigt A, Weber SS, Van den Haute C, Waldenmaier A, Gorner K, et al. Knockdown of transactive response DNA-binding protein (TDP-43) downregulates histone deacetylase 6. *EMBO J*. 2010;29(1):209-21.
- Foster NL, Wilhelmsen K, Sima AA, Jones MZ, D'Amato CJ, Gilman S. Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: a consensus conference. Conference Participants. *Ann Neurol*. 1997;41(6):706-15.
- Freibaum BD, Chitta RK, High AA, Taylor JP. Global analysis of TDP-43 interacting proteins reveals strong association with RNA splicing and translation machinery. *J Proteome Res*. 2010;9(2):1104-20.
- Fujihara S, Brucki SM, Rocha MS, Carvalho AA, Piccolo AC. Prevalence of presenile dementia in a tertiary outpatient clinic. *Arq Neuropsiquiatr*. 2004;62(3A):592-5.
- Gerschman R, Nadig PW, Snell AC, Jr., Nye SW. Effect of high oxygen concentrations on eyes of newborn mice. *Am J Physiol*. 1954;179(1):115-8.
- Geser F, Martinez-Lage M, Robinson J, Uryu K, Neumann M, Brandmeir NJ, et al. Clinical and pathological continuum of multisystem TDP-43 proteinopathies. *Arch Neurol*. 2009;66(2):180-9.
- Geser F, Prvulovic D, O'Dwyer L, Hardiman O, Bede P, Bokde AL, et al. On the development of markers for pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis with and without dementia. *Prog Neurobiol*. 2011;95(4):649-62.
- Geser F, Robinson JL, Malunda JA, Xie SX, Clark CM, Kwong LK, et al. Pathological 43-kDa transactivation response DNA-binding protein in older adults with and without severe mental illness. *Arch Neurol*. 2010;67(10):1238-50.
- Gibb WR. Idiopathic Parkinson's disease and the Lewy body disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1986;12(3):223-34.

- Gibb WR, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1988;51(6):745-52.
- Gibb WR, Lees AJ. Anatomy, pigmentation, ventral and dorsal subpopulations of the substantia nigra, and differential cell death in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1991;54(5):388-96.
- Gijselinck I, Sleegers K, Engelborghs S, Robberecht W, Martin JJ, Vandenberghe R, et al. Neuronal inclusion protein TDP-43 has no primary genetic role in FTD and ALS. *Neurobiol Aging*. 2009;30(8):1329-31.
- Gijselinck I, Van Langenhove T, van der Zee J, Sleegers K, Philtjens S, Kleinberger G, et al. A C9orf72 promoter repeat expansion in a Flanders-Belgian cohort with disorders of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum: a gene identification study. *Lancet Neurol*. 2012;11(1):54-65.
- Gmitrowicz A, Kucharska A. [Developmental disorders in the fourth edition of the American classification: diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM IV -- optional book)]. *Psychiatr Pol*. 1994;28(5):509-21.
- Godena VK, Romano G, Romano M, Appocher C, Klima R, Buratti E, et al. TDP-43 regulates Drosophila neuromuscular junctions growth by modulating Futsch/MAP1B levels and synaptic microtubules organization. *PLoS One*. 2011;6(3):e17808.
- Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S, Kertesz A, Mendez M, Cappa SF, et al. Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology*. 2011;76(11):1006-14.
- Graham A, Davies R, Xuereb J, Halliday G, Kril J, Creasey H, et al. Pathologically proven frontotemporal dementia presenting with severe amnesia. *Brain : a journal of neurology*. 2005;128(Pt 3):597-605.
- Greenway MJ, Andersen PM, Russ C, Ennis S, Cashman S, Donaghy C, et al. ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*. 2006;38(4):411-3.
- Grinberg LT. Estendendo o espectro das denegações lobares frontotemporais: revisão de uma série clinicopatológica de 833 casos de demências: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2006.
- Grinberg LT, Ferretti RE, Farfel JM, Leite R, Pasqualucci CA, Rosemberg S, et al. Brain bank of the Brazilian aging brain study group - a milestone reached and more than 1,600 collected brains. *Cell Tissue Bank*. 2007;8(2):151-62.
- Grinberg LT, Nitrini R, Suemoto CK, Lucena Ferretti-Rebustini RE, Leite RE, Farfel JM, et al. Prevalence of dementia subtypes in a developing

- country: a clinicopathological study. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013;68(8):1140-5.
- Grinberg LT, Rub U, Ferretti RE, Nitrini R, Farfel JM, Polichiso L, et al. The dorsal raphe nucleus shows phospho-tau neurofibrillary changes before the transentorhinal region in Alzheimer's disease. A precocious onset? *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2009a;35(4):406-16.
- Grinberg LT, Rueb U, Alho AT, Heinsen H. Brainstem pathology and non-motor symptoms in PD. *J Neurol Sci*. 2009b;289(1-2):81-8.
- Grinberg LT, Rueb U, Heinsen H. Brainstem: neglected locus in neurodegenerative diseases. *Front Neurol*. 2011;2:42.
- Hall GM. Slavery and African ethnicities in the Americas: Restoring the links. 6 ed. Hill: C, editor. University of North Carolina Press.2005.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*. 1990;186:1-85.
- Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med*. 1992;119(6):598-620.
- Hardy J, Singleton A, Gwinn-Hardy K. Ethnic differences and disease phenotypes. *Science*. 2003;300(5620):739-40.
- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956;11(3):298-300.
- Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, et al. Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2008;64(1):60-70.
- Hayflick L. The future of ageing. *Nature*. 2000a;408(6809):267-9.
- Hayflick L. New approaches to old age. *Nature*. 2000b;403(6768):365.
- Hayoz D, Ziegler T, Brunner HR, Ruiz J. Diabetes mellitus and vascular lesions. *Metabolism*. 1998;47(12 Suppl 1):16-9.
- Hebron ML, Lonskaya I, Sharpe K, Weerasinghe PP, Algarzae NK, Shekoyan AR, et al. Parkin ubiquitinates Tar-DNA binding protein-43 (TDP-43) and promotes its cytosolic accumulation via interaction with histone deacetylase 6 (HDAC6). *J Biol Chem*. 2013;288(6):4103-15.
- 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.

- Hoglinger GU, Melhem NM, Dickson DW, Sleiman PM, Wang LS, Klei L, et al. Identification of common variants influencing risk of the tauopathy progressive supranuclear palsy. *Nat Genet.* 2011;43(7):699-705.
- Holliday R. Aging is no longer an unsolved problem in biology. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1067:1-9.
- Hu WT, Josephs KA, Knopman DS, Boeve BF, Dickson DW, Petersen RC, et al. Temporal lobar predominance of TDP-43 neuronal cytoplasmic inclusions in Alzheimer disease. *Acta neuropathologica.* 2008;116(2):215-20.
- Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol Rev.* 2007;87(4):1175-213.
- IBGE. Síntese de Indicadores Sociais: Uma análise das condições de vida da população brasileira. Estudos e Pesquisas - Informação Demográfica e Socioeconômica. Rio de Janeiro. Brasil: Instituto Brasileiro de Geografia e Bioestatística; 2010.
- IBGE. Sinopse do Senso Demográfico de 2010. Rio de Janeiro. Brasil: Instituto Brasileiro de Geografia e Bioestatística; 2011.
- IBGE. Projeção da população por sexo e idade: Brasil 2000-2060. Rio de Janeiro. Brasil: Instituto Brasileiro de Geografia e Bioestatística; 2012.
- IBGE. Anuário Estatístico do Brasil. Rio de Janeiro. Brasil: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2013. p. 1-56.
- Igaz LM, Kwong LK, Xu Y, Truax AC, Uryu K, Neumann M, et al. Enrichment of C-terminal fragments in TAR DNA-binding protein-43 cytoplasmic inclusions in brain but not in spinal cord of frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol.* 2008;173(1):182-94.
- Inouye K, S.; PE, Pavarini SCI. “Octogenários e cuidadores: perfil sócio-demográfico e correlação da variável qualidade de vida”. *Texto contexto – Enfermagem.* 2008;17(2).
- Cuidados com idosos foram discutidos em seminário [Internet]. 2010.
- Ishii H, Meguro K, Ishizaki J, Shimada M, Yamaguchi S, Sano I, et al. Prevalence of senile dementia in a rural community in Japan: the Tajiri project. *Arch Gerontol Geriatr.* 1999;29(3):249-65.
- Ishiura H, Takahashi Y, Mitsui J, Yoshida S, Kihira T, Kokubo Y, et al. C9ORF72 repeat expansion in amyotrophic lateral sclerosis in the Kii peninsula of Japan. *Arch Neurol.* 2012;69(9):1154-8.

- Jang JH, Kwon MJ, Choi WJ, Oh KW, Koh SH, Ki CS, et al. Analysis of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in Korean patients with familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*. 2013;34(4):1311 e7-9.
- Jellinger KA. Recent developments in the pathology of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*. 2002(62):347-76.
- Jicha GA, Nelson PT. Management of frontotemporal dementia: targeting symptom management in such a heterogeneous disease requires a wide range of therapeutic options. *Neurodegener Dis Manag*. 2011;1(2):141-56.
- Jin K. Modern Biological Theories of Aging. *Aging Dis*. 2010;1(2):72-4.
- Johnson J, Paisan-Ruiz C, Lopez G, Crews C, Britton A, Malkani R, et al. Comprehensive screening of a North American Parkinson's disease cohort for LRRK2 mutation. *Neurodegener Dis*. 2007;4(5):386-91.
- Johnstone B, Hogg JR, Schopp LH, Kapila C, Edwards S. Neuropsychological deficit profiles in senile dementia of the Alzheimer's type. *Arch Clin Neuropsychol*. 2002;17(3):273-81.
- Jorm AF. A short form of the Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly (IQCODE): development and cross-validation. *Psychol Med*. 1994;24(1):145-53.
- Josephs KA, Hodges JR, Snowden JS, Mackenzie IR, Neumann M, Mann DM, et al. Neuropathological background of phenotypical variability in frontotemporal dementia. *Acta neuropathologica*. 2011;122(2):137-53.
- Josephs KA, Jones AG, Dickson DW. Hippocampal sclerosis and ubiquitin-positive inclusions in dementia lacking distinctive histopathology. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2004;17(4):342-5.
- Josephs KA, Murray ME, Whitwell JL, Parisi JE, Petrucelli L, Jack CR, et al. Staging TDP-43 pathology in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*. 2014;127(3):441-50.
- Josephs KA, Stroh A, Dugger B, Dickson DW. Evaluation of subcortical pathology and clinical correlations in FTL-DU subtypes. *Acta neuropathologica*. 2009;118(3):349-58.
- Josephs KA, Whitwell JL, Duffy JR, Vanvoorst WA, Strand EA, Hu WT, et al. Progressive aphasia secondary to Alzheimer disease vs FTL-DU pathology. *Neurology*. 2008a;70(1):25-34.
- Josephs KA, Whitwell JL, Knopman DS, Hu WT, Stroh DA, Baker M, et al. Abnormal TDP-43 immunoreactivity in AD modifies clinicopathologic and radiologic phenotype. *Neurology*. 2008b;70(19 Pt 2):1850-7.

- Josephs KA, Whitwell JL, Parisi JE, Knopman DS, Boeve BF, Geda YE, et al. Argrophilic grains: a distinct disease or an additive pathology? *Neurobiol Aging*. 2008c;29(4):566-73.
- Kabashi E, Lin L, Tradewell ML, Dion PA, Bercier V, Bourguoin P, et al. Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo. *Hum Mol Genet*. 2010;19(4):671-83.
- Kalache A, Veras RP, Ramos LR. O envelhecimento da população: um desafio novo. *Revista de Saúde Pública* 1987;21:200-10.
- Kalaria RN, Maestre GE, Arizaga R, Friedland RP, Galasko D, Hall K, et al. Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. *Lancet Neurol*. 2008;7(9):812-26.
- Kanazawa I. How do neurons die in neurodegenerative diseases? *Trends Mol Med*. 2001;7(8):339-44.
- Katz S, Ford AB, Moskowitz RW, Jackson BA, Jaffe MW. Studies of Illness in the Aged. The Index of Adl: A Standardized Measure of Biological and Psychosocial Function. *JAMA*. 1963;185:914-9.
- Kawahara Y, Mieda-Sato A. TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(9):3347-52.
- Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*. 2003;300(5618):486-9.
- Kertesz A, Munoz D. Relationship between frontotemporal dementia and corticobasal degeneration/progressive supranuclear palsy. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2004;17(4):282-6.
- Kieran D, Kalmar B, Dick JR, Riddoch-Contreras J, Burnstock G, Greensmith L. Treatment with arimoclomol, a coinducer of heat shock proteins, delays disease progression in ALS mice. *Nat Med*. 2004;10(4):402-5.
- Kim EJ, Sidhu M, Gaus SE, Huang EJ, Hof PR, Miller BL, et al. Selective frontoinsular von Economo neuron and fork cell loss in early behavioral variant frontotemporal dementia. *Cerebral cortex*. 2012;22(2):251-9.
- King OD, Gitler AD, Shorter J. The tip of the iceberg: RNA-binding proteins with prion-like domains in neurodegenerative disease. *Brain Res*. 2012;1462:61-80.
- Klos KJ, Ahlskog JE, Josephs KA, Apaydin H, Parisi JE, Boeve BF, et al. Alpha-synuclein pathology in the spinal cords of neurologically asymptomatic aged individuals. *Neurology*. 2006;66(7):1100-2.

- Konno T, Shiga A, Tsujino A, Sugai A, Kato T, Kanai K, et al. Japanese amyotrophic lateral sclerosis patients with GGGGCC hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(4):398-401.
- Kovacs GG, Botond G, Budka H. Protein coding of neurodegenerative dementias: the neuropathological basis of biomarker diagnostics. *Acta neuropathologica*. 2010;119(4):389-408.
- Kovacs GG, Milenkovic I, Wohrer A, Hoftberger R, Gelpi E, Haberler C, et al. Non-Alzheimer neurodegenerative pathologies and their combinations are more frequent than commonly believed in the elderly brain: a community-based autopsy series. *Acta neuropathologica*. 2013;126(3):365-84.
- 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.
- Kowald A, Kirkwood TB. A network theory of ageing: the interactions of defective mitochondria, aberrant proteins, free radicals and scavengers in the ageing process. *Mutat Res*. 1996;316(5-6):209-36.
- Kretschmar H. Brain banking: opportunities, challenges and meaning for the future. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(1):70-8.
- Kringelbach ML, Rolls ET. The functional neuroanatomy of the human orbitofrontal cortex: evidence from neuroimaging and neuropsychology. *Prog Neurobiol*. 2004;72(5):341-72.
- Kuhnlein P, Sperfeld AD, Vanmassenhove B, Van Deerlin V, Lee VM, Trojanowski JQ, et al. Two German kindreds with familial amyotrophic lateral sclerosis due to TARDBP mutations. *Arch Neurol*. 2008;65(9):1185-9.
- Kumar-Singh S. Progranulin and TDP-43: mechanistic links and future directions. *J Mol Neurosci*. 2011;45(3):561-73.
- Kwong LK, Irwin DJ, Walker AK, Xu Y, Riddle DM, Trojanowski JQ, et al. Novel monoclonal antibodies to normal and pathologically altered human TDP-43 proteins. *Acta Neuropathol Commun*. 2014;2:33.
- Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Cleveland DW. TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum Mol Genet*. 2010;19(R1):R46-64.
- Langa KM, Larson EB, Karlawish JH, Cutler DM, Kabeto MU, Kim SY, et al. Trends in the prevalence and mortality of cognitive impairment in the United States: is there evidence of a compression of cognitive morbidity? *Alzheimers Dement*. 2008;4(2):134-44.

- Leite REP. Determinação de elementos traço no encéfalo de idosos em diferentes estados cognitivos.: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2009.
- Libon DJ, Bogdanoff B, Leopold N, Hurka R, Bonavita J, Skalina S, et al. Neuropsychological profiles associated with subcortical white matter alterations and Parkinson's disease: implications for the diagnosis of dementia. *Arch Clin Neuropsychol*. 2001;16(1):19-32.
- Lindau M, Almkvist O, Kushi J, Boone K, Johansson SE, Wahlund LO, et al. First symptoms--frontotemporal dementia versus Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2000;11(5):286-93.
- Ling SC, Albuquerque CP, Han JS, Lagier-Tourenne C, Tokunaga S, Zhou H, et al. ALS-associated mutations in TDP-43 increase its stability and promote TDP-43 complexes with FUS/TLS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(30):13318-23.
- Liscic RM, Grinberg LT, Zidar J, Gitcho MA, Cairns NJ. ALS and FTLD: two faces of TDP-43 proteinopathy. *Eur J Neurol*. 2008;15(8):772-80.
- Liscic RM, Storandt M, Cairns NJ, Morris JC. Clinical and psychometric distinction of frontotemporal and Alzheimer dementias. *Arch Neurol*. 2007;64(4):535-40.
- Lobo A, Launer LJ, Fratiglioni L, Andersen K, Di Carlo A, Breteler MM, et al. Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*. 2000;54(11 Suppl 5):S4-9.
- Lobo A, Saz P, Marcos G, Dia JL, De-la-Camara C, Ventura T, et al. Prevalence of dementia in a southern European population in two different time periods: the ZARADEMP Project. *Acta Psychiatr Scand*. 2007;116(4):299-307.
- 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.
- Lopes MA, Hototian SR, Bustamante SE, Azevedo D, Tatsch M, Bazzarella MC, et al. Prevalence of cognitive and functional impairment in a community sample in Ribeirao Preto, Brazil. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2007;22(8):770-6.
- Lu Y, Ferris J, Gao FB. Frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis-associated disease protein TDP-43 promotes dendritic branching. *Mol Brain*. 2009;2:30.
- Mackenzie IR, Bigio EH, Ince PG, Geser F, Neumann M, Cairns NJ, et al. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis

- from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol*. 2007;61(5):427-34.
- Mackenzie IR, Neumann M, Baborie A, Sampathu DM, Du Plessis D, Jaros E, et al. A harmonized classification system for FTLT-TDP pathology. *Acta neuropathologica*. 2011;122(1):111-3.
- Mackenzie IR, Neumann M, Bigio EH, Cairns NJ, Alafuzoff I, Kril J, et al. Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update. *Acta neuropathologica*. 2009;119(1):1-4.
- Mackenzie IR, Neumann M, Bigio EH, Cairns NJ, Alafuzoff I, Kril J, et al. Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update. *Acta neuropathologica*. 2010;119(1):1-4.
- Majounie E, Renton AE, Mok K, Doppler EG, Waite A, Rollinson S, et al. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol*. 2012;11(4):323-30.
- Majumder P, Chen YT, Bose JK, Wu CC, Cheng WC, Cheng SJ, et al. TDP-43 regulates the mammalian spinogenesis through translational repression of Rac1. *Acta neuropathologica*. 2012;124(2):231-45.
- Mangone CA, Arizaga RL. Dementia in Argentina and other Latin-American countries: An overview. *Neuroepidemiology*. 1999;18(5):231-5.
- Manton KC, Gu XL, Ukraintseva SV. Declining prevalence of dementia in the U.S. elderly population. *Adv Gerontol*. 2005;16:30-7.
- Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, et al. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 2010;465(7295):223-6.
- Matthews FE, Arthur A, Barnes LE, Bond J, Jagger C, Robinson L, et al. A two-decade comparison of prevalence of dementia in individuals aged 65 years and older from three geographical areas of England: results of the Cognitive Function and Ageing Study I and II. *Lancet*. 2013;382(9902):1405-12.
- McDonald KK, Aulas A, Destroismaisons L, Pickles S, Beleac E, Camu W, et al. TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1. *Hum Mol Genet*. 2011;20(7):1400-10.
- McKeith IG, Galasko D, Kosaka K, Perry EK, Dickson DW, Hansen LA, et al. Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium on DLB international workshop. *Neurology*. 1996;47(5):1113-24.

- McKhann GM, Albert MS, Grossman M, Miller B, Dickson D, Trojanowski JQ. Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease. *Arch Neurol*. 2001a;58(11):1803-9.
- McKhann GM, Albert MS, Grossman M, Miller B, Dickson D, Trojanowski JQ, et al. Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease. *Arch Neurol*. 2001b;58(11):1803-9.
- Meguro K, Meguro M, Caramelli P, Ishizaki J, Ambo H, Chubaci RY, et al. Elderly Japanese emigrants to Brazil before World War II: II. Prevalence of senile dementia. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2001;16(8):775-9.
- Mendez MF, Shapira JS, McMurtray A, Licht E, Miller BL. Accuracy of the clinical evaluation for frontotemporal dementia. *Arch Neurol*. 2007;64(6):830-5.
- Mesulam M, Wicklund A, Johnson N, Rogalski E, Leger GC, Rademaker A, et al. Alzheimer and frontotemporal pathology in subsets of primary progressive aphasia. *Ann Neurol*. 2008;63(6):709-19.
- Miller RG, Mitchell JD, Moore DH. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;3:CD001447.
- Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, et al. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1991;41(4):479-86.
- Moisse K, Mephram J, Volkening K, Welch I, Hill T, Strong MJ. Cytosolic TDP-43 expression following axotomy is associated with caspase 3 activation in NFL-/- mice: support for a role for TDP-43 in the physiological response to neuronal injury. *Brain Res*. 2009a;1296:176-86.
- Moisse K, Volkening K, Leystra-Lantz C, Welch I, Hill T, Strong MJ. Divergent patterns of cytosolic TDP-43 and neuronal progranulin expression following axotomy: implications for TDP-43 in the physiological response to neuronal injury. *Brain Res*. 2009b;1249:202-11.
- Morris JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology*. 1993;43(11):2412-4.
- Murayama S, Saito Y. Neuropathological diagnostic criteria for Alzheimer's disease. *Neuropathology*. 2004;24(3):254-60.
- Nakashima-Yasuda H, Uryu K, Robinson J, Xie SX, Hurtig H, Duda JE, et al. Co-morbidity of TDP-43 proteinopathy in Lewy body related diseases. *Acta neuropathologica*. 2007;114(3):221-9.

- Narayanan RK, Mangelsdorf M, Panwar A, Butler TJ, Noakes PG, Wallace RH. Identification of RNA bound to the TDP-43 ribonucleoprotein complex in the adult mouse brain. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2013;14(4):252-60.
- Nasri F. O envelhecimento populacional no Brasil. *Einstein.* 2008;6(Supl1):S4-S6.
- Neary D, Snowden J, Mann D. Frontotemporal dementia. *Lancet Neurol.* 2005;4(11):771-80.
- 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, Kwong LK, Truax AC, Vanmassenhove B, Kretzschmar HA, Van Deerlin VM, et al. TDP-43-positive white matter pathology in frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007;66(3):177-83.
- 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.
- NIA-RR. Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease. The National Institute on Aging, and Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of Alzheimer's Disease. *Neurobiol Aging.* 1997;18(4 Suppl):S1-2.
- Nimchinsky EA, Gilissen E, Allman JM, Perl DP, Erwin JM, Hof PR. A neuronal morphologic type unique to humans and great apes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(9):5268-73.
- Nitrini R, Bottino CM, Albala C, Custodio Capunay NS, Ketzoian C, Llibre Rodriguez JJ, et al. Prevalence of dementia in Latin America: a collaborative study of population-based cohorts. *Int Psychogeriatr.* 2009;21(4):622-30.
- Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, et al. Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. *Cell reports.* 2013;4(1):124-34.
- Ogaki K, Li Y, Atsuta N, Tomiyama H, Funayama M, Watanabe H, et al. Analysis of C9orf72 repeat expansion in 563 Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging.* 2012;33(10):2527 e11-6.
- OMS. Envelhecimento ativo: uma política de saúde. Brasília. Brasil. 2005.
- ONU. World Population Ageing, 1950-2050. Divisão Populacional da Organização das Nações Unidas. New York. United States. 2002.

- ONU. World Population Prospects: The 2012 Revision of World Population. New York. United States. 2013.
- Onyike CU, Diehl-Schmid J. The epidemiology of frontotemporal dementia. *Int Rev Psychiatry*. 2013;25(2):130-7.
- Ou SH, Wu F, Harrich D, Garcia-Martinez LF, Gaynor RB. Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *J Virol*. 1995;69(6):3584-96.
- Ozawa M, Ninomiya T, Ohara T, Doi Y, Uchida K, Shirota T, et al. Dietary patterns and risk of dementia in an elderly Japanese population: the Hisayama Study. *Am J Clin Nutr*. 2013;97(5):1076-82.
- Pan XD, Chen XC. Clinic, neuropathology and molecular genetics of frontotemporal dementia: a mini-review. *Transl Neurodegener*. 2013;2(1):8.
- Papaléo-Netto M. O estudo da velhice no século XX: histórico, definição do campo e termos básicos. In: Koogan G, editor. Tratado de Geriatria e Gerontologia. 2 ed. ed. Rio de Janeiro 2006.
- Papma JM, Seelaar H, de Koning I, Hasan D, Reijls A, Valkema R, et al. Episodic memory impairment in frontotemporal dementia; a (9)(9)mTc-HMPAO SPECT study. *Curr Alzheimer Res*. 2013;10(3):332-9.
- Passant U, Elfgrén C, Englund E, Gustafson L. Psychiatric symptoms and their psychosocial consequences in frontotemporal dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2005;19 Suppl 1:S15-8.
- Perera FP. Environment and cancer: who are susceptible? *Science*. 1997;278(5340):1068-73.
- Petrovich GD, Canteras NS, Swanson LW. Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res Brain Res Rev*. 2001;38(1-2):247-89.
- Pick A. Über die beziehungen der senilen Hirnatrophie zur Aphasie. . *Prag Med*. 1892(17):165-7.
- Pirttilä T, Jarvenpää R, Dastidar P, Frey H. Brain atrophy in neurodegenerative diseases. Quantitative and qualitative CT analysis. *Acta Radiol*. 1993;34(3):296-302.
- Polymenidou M, Lagier-Tourenne C, Hutt KR, Huelga SC, Moran J, Liang TY, et al. Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nat Neurosci*. 2011;14(4):459-68.

- Price JL, McKeel DW, Jr., Buckles VD, Roe CM, Xiong C, Grundman M, et al. Neuropathology of nondemented aging: presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*. 2009;30(7):1026-36.
- Rabinovici GD, Miller BL. Frontotemporal lobar degeneration: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and management. *CNS Drugs*. 2010;24(5):375-98.
- Ramos LR, Veras RP, Kalache A. Envelhecimento populacional: uma realidade brasileira. *Revista de Saúde pública*. 1987;21(3):211-24.
- Ratnavalli E, Brayne C, Dawson K, Hodges JR. The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology*. 2002;58(11):1615-21.
- 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.
- Riboldi G, Zanetta C, Ranieri M, Nizzardo M, Simone C, Magri F, et al. Antisense oligonucleotide therapy for the treatment of C9ORF72 ALS/FTD diseases. *Mol Neurobiol*. 2014;50(3):721-32.
- Rocca WA, Petersen RC, Knopman DS, Hebert LE, Evans DA, Hall KS, et al. Trends in the incidence and prevalence of Alzheimer's disease, dementia, and cognitive impairment in the United States. *Alzheimers Dement*. 2011;7(1):80-93.
- Roeber S, Mackenzie IR, Kretschmar HA, Neumann M. TDP-43-negative FTL-D is a significant new clinico-pathological subtype of FTL-D. *Acta neuropathologica*. 2008;116(2):147-57.
- 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 : a journal of neurology*. 2011;134(Pt 9):2565-81.
- Rohrer JD, Rossor MN, Warren JD. Alzheimer's pathology in primary progressive aphasia. *Neurobiol Aging*. 2012;33(4):744-52.
- Rollo CD. Aging and the Mammalian regulatory triumvirate. *Aging Dis*. 2010;1(2):105-38.
- Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med*. 2004;10 Suppl:S10-7.
- Rosso SM, Donker Kaat L, Baks T, Joosse M, de Koning I, Pijnenburg Y, et al. Frontotemporal dementia in The Netherlands: patient characteristics and prevalence estimates from a population-based study. *Brain : a journal of neurology*. 2003;126(Pt 9):2016-22.

- Rozemuller AJ, van Gool WA, Eikelenboom P. The neuroinflammatory response in plaques and amyloid angiopathy in Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2005;4(3):223-33.
- Rub U, Heinsen H, Brunt ER, Landwehrmeyer B, Den Dunnen WF, Gierga K, et al. The human premotor oculomotor brainstem system - can it help to understand oculomotor symptoms in Huntington's disease? *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2009;35(1):4-15.
- 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.
- Sabbagh MN, Sandhu SS, Farlow MR, Vedders L, Shill HA, Caviness JN, et al. Correlation of clinical features with argyrophilic grains at autopsy. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2009;23(3):229-33.
- Sato T, Takeuchi S, Saito A, Ding W, Bamba H, Matsuura H, et al. Axonal ligation induces transient redistribution of TDP-43 in brainstem motor neurons. *Neuroscience*. 2009;164(4):1565-78.
- 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*. 2013;18(1):79-85.
- Schmitt FA, Davis DG, Wekstein DR, Smith CD, Ashford JW, Markesbery WR. "Preclinical" AD revisited: neuropathology of cognitively normal older adults. *Neurology*. 2000;55(3):370-6.
- Schrijvers EM, Verhaaren BF, Koudstaal PJ, Hofman A, Ikram MA, Breteler MM. Is dementia incidence declining?: Trends in dementia incidence since 1990 in the Rotterdam Study. *Neurology*. 2012;78(19):1456-63.
- Schumacher A, Friedrich P, Diehl-Schmid J, Ibach B, Perneczky R, Eisele T, et al. No association of TDP-43 with sporadic frontotemporal dementia. *Neurobiol Aging*. 2009;30(1):157-9.
- Schwartz RS. Racial profiling in medical research. *N Engl J Med*. 2001;344(18):1392-3.
- Seeley WW, Carlin DA, Allman JM, Macedo MN, Bush C, Miller BL, et al. Early frontotemporal dementia targets neurons unique to apes and humans. *Ann Neurol*. 2006;60(6):660-7.
- Shiga A, Ishihara T, Miyashita A, Kuwabara M, Kato T, Watanabe N, et al. Alteration of POLDIP3 splicing associated with loss of function of TDP-43 in tissues affected with ALS. *PLoS One*. 2012;7(8):e43120.
- Shineman DW, Fillit HM. Novel strategies for the prevention of dementia from Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci*. 2009;11(2):129-34.

- Snowden JS, Neary D, Mann DM. Frontotemporal dementia. *Br J Psychiatry*. 2002;180:140-3.
- Sohal RS, Allen RG. Relationship between metabolic rate, free radicals, differentiation and aging: a unified theory. *Basic Life Sci*. 1985;35:75-104.
- Soto C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(1):49-60.
- Soto C, Estrada LD. Protein misfolding and neurodegeneration. *Arch Neurol*. 2008;65(2):184-9.
- Spillantini MG, Bird TD, Ghetti B. Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies. *Brain Pathol*. 1998;8(2):387-402.
- Spillantini MG, Tolnay M, Love S, Goedert M. Microtubule-associated protein tau, heparan sulphate and alpha-synuclein in several neurodegenerative diseases with dementia. *Acta neuropathologica*. 1999;97(6):585-94.
- Spitzer RL, Williams JB, Gibbon M, First MB. The Structured Clinical Interview for DSM-III-R (SCID). I: History, rationale, and description. *Arch Gen Psychiatry*. 1992;49(8):624-9.
- 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.
- Strong MJ. The evidence for altered RNA metabolism in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Neurol Sci*. 2010;288(1-2):1-12.
- Strong MJ, Volkening K, Hammond R, Yang W, Strong W, Leystra-Lantz C, et al. TDP43 is a human low molecular weight neurofilament (hNFL) mRNA-binding protein. *Mol Cell Neurosci*. 2007;35(2):320-7.
- Suemoto CK, Nitrini R, Grinberg LT, Ferretti RE, Farfel JM, Leite RE, et al. Atherosclerosis and dementia: a cross-sectional study with pathological analysis of the carotid arteries. *Stroke*. 2011;42(12):3614-5.
- Swarup V, Audet JN, Phaneuf D, Kriz J, Julien JP. Abnormal regenerative responses and impaired axonal outgrowth after nerve crush in TDP-43 transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci*. 2012;32(50):18186-95.
- Tan RH, Shepherd CE, Kril JJ, McCann H, McGeachie A, McGinley C, et al. Classification of FTLD-TDP cases into pathological subtypes using antibodies against phosphorylated and non-phosphorylated TDP43. *Acta Neuropathol Commun*. 2013;1(1):33.

- Tanzi RE, Bertram L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell*. 2005;120(4):545-55.
- Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science*. 2002;296(5575):1991-5.
- The Lund and Manchester groups. Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia. The Lund and Manchester Groups. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994. p. 416-8.
- Tollervey JR, Curk T, Rogelj B, Briese M, Cereda M, Kayikci M, et al. Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nat Neurosci*. 2011;14(4):452-8.
- Tosato M, Zamboni V, Ferrini A, Cesari M. The aging process and potential interventions to extend life expectancy. *Clin Interv Aging*. 2007;2(3):401-12.
- Tranel D, Hyman BT. Neuropsychological correlates of bilateral amygdala damage. *Arch Neurol*. 1990;47(3):349-55.
- Tsai CP, Soong BW, Tu PH, Lin KP, Fuh JL, Tsai PC, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 causes familial and sporadic ALS in Taiwan. *Neurobiol Aging*. 2012;33(9):2232 e11- e18.
- Uryu K, Nakashima-Yasuda H, Forman MS, Kwong LK, Clark CM, Grossman M, et al. Concomitant TAR-DNA-binding protein 43 pathology is present in Alzheimer disease and corticobasal degeneration but not in other tauopathies. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008;67(6):555-64.
- van Heemst D, Beekman M, Mooijaart SP, Heijmans BT, Brandt BW, Zwaan BJ, et al. Reduced insulin/IGF-1 signalling and human longevity. *Aging Cell*. 2005;4(2):79-85.
- Vanden Broeck L, Naval-Sanchez M, Adachi Y, Diaper D, Dourlen P, Chapuis J, et al. TDP-43 loss-of-function causes neuronal loss due to defective steroid receptor-mediated gene program switching in *Drosophila*. *Cell Rep*. 2013;3(1):160-72.
- Villemagne VL, Pike KE, Darby D, Maruff P, Savage G, Ng S, et al. Abeta deposits in older non-demented individuals with cognitive decline are indicative of preclinical Alzheimer's disease. *Neuropsychologia*. 2008;46(6):1688-97.
- Voisine C, Pedersen JS, Morimoto RI. Chaperone networks: tipping the balance in protein folding diseases. *Neurobiol Dis*. 2010;40(1):12-20.
- Volkering K, Leystra-Lantz C, Yang W, Jaffee H, Strong MJ. Tar DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43), 14-3-3 proteins and copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) interact to modulate NFL mRNA stability. Implications

- for altered RNA processing in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Brain Res.* 2009;1305:168-82.
- Wang IF, Wu LS, Shen CK. TDP-43: an emerging new player in neurodegenerative diseases. *Trends Mol Med.* 2008;14(11):479-85.
- Watts GD, Wymer J, Kovach MJ, Mehta SG, Mumm S, Darvish D, et al. Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat Genet.* 2004;36(4):377-81.
- Wegorzewska I, Bell S, Cairns NJ, Miller TM, Baloh RH. TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(44):18809-14.
- Weihl CC, Temiz P, Miller SE, Watts G, Smith C, Forman M, et al. TDP-43 accumulation in inclusion body myopathy muscle suggests a common pathogenic mechanism with frontotemporal dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008;79(10):1186-9.
- Weinert BT, Timiras PS. Invited review: Theories of aging. *J Appl Physiol (1985).* 2003;95(4):1706-16.
- Whitwell JL, Sampson EL, Watt HC, Harvey RJ, Rossor MN, Fox NC. A volumetric magnetic resonance imaging study of the amygdala in frontotemporal lobar degeneration and Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2005;20(4):238-44.
- WHO. Report of the World Health Organization. Active ageing: a policy framework. 2002 Mar. Report No.: 1368-5538 (Print)
- 1368-5538 (Linking) Contract No.: 1.
- Wilson AC, Dugger BN, Dickson DW, Wang DS. TDP-43 in aging and Alzheimer's disease - a review. *Int J Clin Exp Pathol.* 2011;4(2):147-55.
- Wilson RS, Yu L, Trojanowski JQ, Chen EY, Boyle PA, Bennett DA, et al. TDP-43 pathology, cognitive decline, and dementia in old age. *JAMA Neurol.* 2013;70(11):1418-24.
- Winton MJ, Igaz LM, Wong MM, Kwong LK, Trojanowski JQ, Lee VM. Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA-binding protein (TDP-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation. *J Biol Chem.* 2008;283(19):13302-9.
- Wolf DS, Gearing M, Snowden DA, Mori H, Markesbery WR, Mirra SS. Progression of regional neuropathology in Alzheimer disease and normal elderly: findings from the Nun study. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 1999;13(4):226-31.

- Wong LLR, Carvalho JA. O rápido processo de envelhecimento populacional do Brasil: sérios desafios para as políticas públicas. *Revista Brasileira de Estudos de População*. 2006;23(1).
- Wu LS, Cheng WC, Hou SC, Yan YT, Jiang ST, Shen CK. TDP-43, a neuro-pathosignature factor, is essential for early mouse embryogenesis. *Genesis*. 2010;48(1):56-62.
- Yaffe K, Hoang T. Nonpharmacologic treatment and prevention strategies for dementia. *Continuum (Minneap Minn)*. 2013;19(2 Dementia):372-81.
- Zou ZY, Li XG, Liu MS, Cui LY. Screening for C9orf72 repeat expansions in Chinese amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiol Aging*. 2013;34(6):1710 e5-6.

ANEXO 1

Suckler
18.01.12

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **23/11/2011**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 464/11 intitulado: **“CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DA PROTEÍNA TDP-43 DURANTE O ENVELHECIMENTO NORMAL: UMA ANÁLISE EM CÉREBROS HUMANOS POSTMORTEM”** apresentado pelo Programa de FISIOPATOLOGIA EXPERIMENTAL

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, 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: Lea Tenenholz Grinberg

Pesquisador (a) Executante: Camila Fernandes Nascimento

Encaminhe-se à CPG-FMUSP
para as devidas providências.
S.P., 17/10/11

CEP-FMUSP, 25 de Novembro de 2011.

Prof. Dra. Elia Garcia Caldini
Programa Fisiopatologia Experimental
Pós-Graduação em Ciências
Coordenador

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador interino
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
e-mail: cep_fmusp@hcnet.usp.br

ANEXO 2

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Biobanco para Estudos no Envelhecimento

Pesquisador: Wilson Jacob Filho

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 22262613.0.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 458.272

Data da Relatoria: 13/11/2013

Apresentação do Projeto:

A apresentação projeto de desenvolvimento do biobanco esta clara e apresenta todos os necessários descritos na Resolução da CNS número 441/2011 para a constituição do biobanco para Estudos no Envelhecimento.

Objetivo da Pesquisa:

A constituição do Biobanco para Estudos no Envelhecimento terá como objetivo Primário:

Avaliar através de protocolo rigoroso o perfil clínico e anatomopatológico de um grande número de indivíduos submetidos à necropsia, no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC). Os indivíduos avaliados deverão compor uma amostra heterogênea do envelhecimento (idade acima de 18 anos) englobando indivíduos com e sem doenças crônico-degenerativas;

O objetivo Secundário será o de promover a coleção de grande quantidade de dados e material biológico para uma rede de pesquisas interdisciplinares, que possam abranger aspectos do envelhecimento normal e das doenças crônico-degenerativas relacionadas. Formar massa crítica de pesquisadores, em diversos graus de formação e também de caráter multidisciplinar concentrados no estudo do envelhecimento humano.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: não haverá riscos para os sujeitos de pesquisa.

Benefícios: não haverá benefícios para o sujeito de pesquisa.

Endereço: DOUTOR ARNALDO 455

Bairro: PACAEMBU

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3061-8004

CEP: 01.246-903

E-mail: cep.fm@usp.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 458.272

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A constituição de Biobancos no Brasil deve ser incentivada. Neste caso a constituição deste Biobanco poderá contribuir para o acesso de uma maior amostragem de indivíduos de nossa população permitindo encontrar particularidades que sejam utilizadas para estudar o envelhecimento de uma população que tende a ser nas próximas décadas representativa no Brasil.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE foi reelaborado e as correções sugeridas realizadas.

Recomendações:

não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto sem pendências éticas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado

SAO PAULO, 14 de Novembro de 2013

Assinador por:
Paulo Euripedes Marchiori
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 455
Bairro: PACAEMBU
UF: SP Município: SAO PAULO CEP: 01.246-903
Telefone: (11)3061-8004 E-mail: cep.fm@usp.br

ANEXO 3

ENTREVISTA CLÍNICA

NPROT

NSVO

Data da necropsia: ____/____/____

Data Óbito: _____ H. Óbito: _____ H. Necro: _____ ΔT Morte: _____ H Início Entrev: _____

Nome: _____ Idade: _____ DN: ____/____/____

Sexo: _____ Raça: B N P A Natural: _____ Proced: _____ Estado Civil: S C V A D Filhos: _____

Escolaridade: _____ anos (_____) Dextro Canhoto

Profissão: do lar doméstica outros _____

Situação: Ainda trabalhava Aposentado _____ a Ap por invalidez _____ a Outro _____

Informante

Parentesco: _____ Freq com o pte: D S M _____ Cuidador primário: sim não NA

Escolaridade do informante: _____ Com quem residia: _____

Causa do Óbito:

Causas básicas/ achados clínicos: _____

Como correu o óbito: em casa logradouro público no hospital/ transferência/ APH: _____

HPMA:

AP: Nega ou desconhece qualquer antecedente patológico

HAS DM DAC ICC (TF _____) Arritmia MP IVP/OAC IRC DLP TCE

AVCi // h prévio? Há _____ a – sem seqüela com seqüela: cognitiva motora _____

AIDS Sífilis AO/ OP Dist Tireóide Bronquite/ Asma DPOC _____

Down Depressão Esquizofrenia Mania TOC D Parkinson Neoplasia _____

Internação Psiquiátrica _____ Tentativa de suicídio _____

TTOs anteriores: Clínicos: _____ Cirúrgicos: _____

Não fazia tto ou acompanhamento médico atualmente Nunca foi ao médico: recusa/ sem acesso

Sd demencial diagnosticada em vida: não sim Há _____ a Etiologia: _____

História compatível com Síndrome demencial: não sim

Início dos sintomas: lento súbito memória comportamento outro _____

Curso: lento e progressivo rápido evolução em degraus curso flutuante

Função anterior à morte

Acuidades visual e auditiva preservadas ↓ acuidade visual óculos hipoacusia prótese

Dentição preservada falhas dent/ anodontia uso de prótese dentária disfagia SNG/SNE/ GTS

Sedentário Atividade física: doméstica caminhada trabalho outra _____ Freq _____/sem

Andava: s/ auxílio c/ auxílio: pessoas parede/ móveis equipamentos auxiliares _____

Acamado _____ Amputações _____ Lesões cutâneas (úlceras) _____

Independente Dependente Tomava decisões sozinho Não tomava decisões

Em que situações convivia com muitas pessoas _____

Informant questionnaire on cognitive decline in the elderly

(IQCODE – Versão retrospectiva)

Gostaríamos que você se lembrasse de como era seu amigo ou familiar há 10 anos atrás e compare com o estado em que ele estava há 3 meses antes de sua morte.

Comparada com há 10 anos atrás, como estava a pessoa antes de sua morte:

	Muito melhor (1)	Um pouco melhor (2)	Não muito alterado (3)	Um pouco pior (4)	Muito pior (5)
1. Reconhecer a face das pessoas amigas e da família					
2. Lembrar do nome de parentes e amigos					
3. Lembrar de coisas sobre a família e amigos (aniversários, ocupações, endereços...)					
4. Lembrar de coisas que aconteceram recentemente					
5. Lembrar de conversas que teve nos últimos dias					
6. Esquecia o que queria dizer no meio de uma conversa					
7. lembrar-se de seu próprio endereço e telefone					
8. lembrar (saber) que dia e mês era					
9. Lembrar onde as coisas são usualmente guardadas					
10. Lembrar-se de onde encontrar as coisas que foram colocadas em lugares fora do comum					
11. Adaptar-se a qualquer mudança na sua rotina diária					
12. Saber como funcionam os eletrodomésticos					
13. Aprender a usar novos eletrodomésticos/ utensílios domésticos					
14. Aprender coisas novas em geral					
15. Lembrar-se de coisas que aconteceram em sua vida quando era jovem					
16. Lembrar-se de coisas que aprendeu quando era jovem					
17. Entender o significado de palavras não comuns					
18. Entender o significado do que está escrito em jornais e revistas					
19. Acompanhar uma estória em um livro ou pela TV					
20. Escrever uma carta para um amigo ou com fins de trabalho					
21. Saber sobre eventos históricos importantes do passado					
22. Tomar decisões com problemas do dia a dia					
23. Manusear dinheiro para compras					
24. Lidar com problemas financeiros (ex: pensão, conta bancária)					
25. Lidar com outros problemas matemáticos, por exemplo: saber quanto comprar de comida, saber quanto tempo se passou entre as visitas dos familiares/ amigos.					
26. Usar sua inteligência para entender o que está acontecendo e o motivo pelo qual está acontecendo.					

Total: _____

ESCORE CLÍNICO DE DEMÊNCIA – FOLHA DE REGISTRO

Esta é uma entrevista semi-estruturada. Por favor, faça todas estas perguntas. Faça quaisquer questões adicionais que sejam necessárias para determinar o CDR do sujeito. Por favor, tome nota das informações das perguntas adicionais.

QUESTÕES SOBRE MEMÓRIA PARA O INFORMANTE

1. Ele/ela tem algum problema com sua memória ou seu pensamento (raciocínio)? SIM NÃO
- 1a - Se sim, é um problema constante? (em oposição a eventual, raro) SIM NÃO
2. Ele/ela pode se lembrar de eventos recentes? Freqüentemente Às vezes Raramente
3. Ele/ela pode se lembrar de uma lista curta de itens (compras)? Freqüentemente Às vezes Raramente
4. Houve algum declínio na memória durante o último ano? SIM NÃO
5. Sua memória está comprometida a tal ponto que teria interferido em suas atividades de vida diária de alguns anos atrás? (ou atividades pré-aposentadoria) (opinião de outros informantes) SIM NÃO
6. Ele/ela se esquece completamente de um evento importante (ex. viagem, festa, casamento em família) algumas semanas depois do evento? Freqüentemente Às vezes Raramente
7. Ele/ela se esquece de detalhes pertinentes de um evento importante? Freqüentemente Às vezes Raramente
8. Ele/ela se esquece completamente de informações importantes do passado distante (ex. data de nascimento, data de casamento, local do emprego)? Freqüentemente Às vezes Raramente
9. OBS - Questão removida por não ser aplicável.

QUESTÕES SOBRE ORIENTAÇÃO PARA O INFORMANTE

Com que frequência ele/ela sabe o exato:

1. Dia do Mês?
Freqüentemente Às vezes Raramente Não sabe
2. Mês?
Freqüentemente Às vezes Raramente Não sabe
3. Ano?
Freqüentemente Às vezes Raramente Não sabe
4. Dia da semana?
Freqüentemente Às vezes Raramente Não sabe
5. Ele/ela tem dificuldades com relações temporais (quando os eventos ocorreram em relação uns com os outros)?
Freqüentemente Às vezes Raramente Não sabe

6. Ele/ela pode achar seu caminho em ruas conhecidas?
Freqüentemente	Às vezes	Raramente	Não sabe
7. Com que freqüência ele/ela sabe como ir de um lugar para o outro fora de sua vizinhança?
Freqüentemente	Às vezes	Raramente	Não sabe
8. Com que freqüência ele/ela pode encontrar seu caminho dentro de casa?
Freqüentemente	Às vezes	Raramente	Não sabe

QUESTÕES SOBRE JULGAMENTO E RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS PARA O INFORMANTE

1. Em geral, se você tivesse que avaliar as habilidades dele/dela para resolver problemas atualmente, você consideraria que elas são:
Tão boas quanto sempre foram.	Boas, mas não tão boas quanto antes.
Regulares.	Ruins.
	Não há nenhuma habilidade.
2. Avalie sua habilidade em lidar com pequenas quantias de dinheiro (ex.: trocar dinheiro, dar gorjeta):
Não há perda.	Alguma perda.	Perda grave
3. Avalie sua habilidade em lidar com transações financeiras complicadas (ex.: pagar contas, controle de conta bancária):
Não há perda.	Alguma perda.	Perda grave.
4. Ele/ela pode lidar com uma emergência doméstica (ex. vazamento nos encanamentos, pequenos incêndios):
- Tão bem quanto antes.
- Pior do que antes por causa da dificuldade de pensamento (raciocínio).
- Pior do que antes, por outra razão. (qual) _____
5. Ele/ela pode entender situações ou explicações?
Freqüentemente	Às vezes	Raramente	Não sabe
6. Ele/ela se comporta de modo apropriado* [isto é, em sua maneira usual (pré-doença)] em situações sociais e em interação com outras pessoas?
Freqüentemente	Às vezes	Raramente	Não sabe
- * Este item avalia comportamento, não aparência.

QUESTÕES SOBRE ASSUNTOS COMUNITÁRIOS PARA O INFORMANTE

Ocupacional

1. O sujeito ainda está trabalhando?	SIM	NÃO	N/A
Se não aplicável - vá para o item número 4
Se sim - vá para o item número 3
Se não - vá para o item número 2			
2. Os problemas de memória ou de pensamento (raciocínio) contribuíram para a decisão do sujeito de se aposentar? (A questão 4 é a próxima)	SIM	NÃO	N/A
3. O sujeito tem dificuldade significativa em seu trabalho por causa de problemas com memória ou pensamento (raciocínio)?			
Raramente ou nunca	Às vezes	Freqüentemente	Não sabe

Social

4. Ele/ela alguma vez dirigiu carro?	SIM	NÃO	
5. Ele/ela dirige carros atualmente?	SIM	NÃO	
6. Se não, é devido a problemas de memória ou pensamento (raciocínio)?	SIM	NÃO	
7. Se ele/ela ainda está dirigindo, há problemas ou riscos devido ao pensamento (raciocínio) pobre?	SIM	NÃO	
8. Ele/ela é capaz de fazer compras para suas próprias necessidades independentemente?			
Raramente ou nunca	Às vezes	Freqüentemente	Não Sabe
(precisa ser acompanhado em qualquer compra)	(Pode comprar um número limitado de itens, compra itens duplicados ou esquece itens necessários)		
9. Ele/ela é capaz de fazer atividades independentemente fora de sua casa?			
Raramente ou nunca	Às vezes	Freqüentemente	Não sabe
(Freqüentemente incapaz de realizar atividades sem ajuda)	(Atividades limitadas ou de rotina, por exemplo, participação superficial na igreja ou reuniões, idas a salão de beleza).	(Participação significativa em atividades, por exemplo, votar)	
10. Ele/ela é levado a eventos sociais fora da casa de familiares?	SIM	NÃO	
Se não, por que não?			
11. Um observador casual do comportamento do sujeito pensaria que ele está doente?	SIM	NÃO	
12. Se institucionalizado, ele/ela participa bem de atividades sociais?	SIM	NÃO	

IMPORTANTE:

As informações coletadas são suficientes para classificar o nível de comprometimento do sujeito em assuntos comunitários?

Se não, por favor, investigue mais.

Atividades na comunidade: tais como ir à igreja, visitar amigos ou família, atividades políticas, organizações profissionais tais como associações, outros grupos profissionais, clubes sociais, organização de serviços, programas educacionais).

* Por favor, adicione notas se necessário para esclarecer o nível de funcionamento do sujeito nesta área.

QUESTÕES SOBRE O LAR E ATIVIDADES DE LAZER PARA O INFORMANTE

1a) Que mudanças ocorreram em suas habilidades de realizar tarefas domésticas? _____

1b) O que ele/ela ainda pode fazer bem? _____

2a) Que mudanças ocorreram em suas habilidades para realizar seus passatempos (hobbies)? _____

2b) O que ele/ela ainda pode fazer bem? _____

3) Se institucionalizado, o que ele/ela não pode mais fazer bem (Casa e Hobbies) _____

Atividades da vida diária (Blessed):

	Nenhuma perda		Perda grave
4. Habilidade para realizar tarefas domésticas	0	0,5	1
Por favor, descreva _____			
5. Ele/ela é capaz de realizar tarefas domésticas até o nível de: (Escolha uma, o informante não precisa ser perguntado diretamente)			
_____ <u>Sem função significativa</u>			
(Realiza atividades simples, tais como fazer a cama, somente com muita supervisão)			
_____ <u>Funciona somente em atividades limitadas</u>			
(Com alguma supervisão, lava a louça com limpeza aceitável, coloca a mesa)			
_____ <u>Funciona independentemente em algumas atividades</u>			
(Opera equipamentos, tal como aspirador de pó, prepara refeições simples)			
_____ <u>Funciona em atividades usuais mas não no nível usual</u>			
_____ <u>Funciona normalmente em atividades usuais</u>			

IMPORTANTE:

As informações coletadas são suficientes para classificar o nível de comprometimento do sujeito em CASA & HOBBIES?

Se não, por favor investigue mais.

Tarefas Domésticas: Tais como cozinhar, lavar, limpar, fazer compras, levar o lixo para fora, limpar o quintal, manutenção de cuidados básicos e reparos básicos na casa

Hobbies: Costurar, pintar, artesanato, leitura, entretenimento, fotografia, jardinagem, ir ao teatro ou concerto, trabalho em madeira, participação em esportes.

QUESTÕES SOBRE O AUTOCUIDADO PARA O INFORMANTE

“Qual sua estimativa da habilidade mental dele (a) nas seguintes áreas:”

Vestir-se (Blessed)	Sem ajuda (0)	Às vezes não abotoa os botões corretamente,... (1)	Seqüência errada - esquece itens comumente. (2)	Incapaz de se vestir (3)
Lavar-se (Arrumar-se)	Sem ajuda (0)	Necessita de estímulo (1)	Algumas vezes precisa de ajuda (2)	Sempre – ou quase sempre – precisa de ajuda (3)
Hábitos À mesa	De modo limpo; utiliza os talheres adequados. (0)	De modo desorganizado; utiliza apenas colher. (1)	Apenas sólidos simples (2)	Tem que ser alimentado (3)
Controle de esfíncter	Controle completo normal (0)	Ocasionalmente molha a cama (1)	Freqüentemente molha a cama (2)	Duplamente incontinente (3)

*Escore 1 pode ser considerado se o auto-cuidado estiver comprometido quando comparado a um estado anterior, mesmo que não receba estímulo.

ESCORE CLÍNICO DE DEMÊNCIA (CDR)

Escore Clínico de Demência (CDR)	0	0,5	1	2	3
----------------------------------	---	-----	---	---	---

	Comprometimento				
	Normal 0	Questionável 0,5	Leve 1	Moderada 2	Grave 3
Memória	Sem perda de memória ou esquecimento leve e inconstante.	Esquecimento leve e constante (em oposição a eventual); recordação parcial de eventos; esquecimento "benigno".	Moderada perda de memória; mais marcada para eventos recentes; déficit interfere nas atividades cotidianas.	Perda de memória grave; somente retém material intensamente aprendido; material novo rapidamente perdido.	Perda de memória grave; restam apenas fragmentos.
Orientação	Plenamente orientado.	Plenamente orientado, exceto por leve dificuldade nas relações temporais.	Dificuldade moderada com relações temporais; orientado para lugar do exame; pode ter desorientação geográfica em outros lugares.	Dificuldade grave com relações temporais; usualmente desorientado para o tempo, frequentemente para o espaço.	Orientado apenas para pessoa.
Julgamento e resolução de problemas	Resolve bem problemas diários e administra bem negócios e finanças; bom julgamento em relação ao desempenho prévio.	Leve dificuldade em resolver problemas, similaridades e diferenças.	Dificuldade moderada para administrar problemas, similaridades e diferenças; julgamento social usualmente mantido.	Grave dificuldade em administrar problemas, similaridades e diferenças; julgamento social usualmente comprometido.	Incapaz de fazer julgamentos ou de resolver problemas.
Assuntos Comunitários	Função independente no nível usual no trabalho, em compras, grupos sociais ou de voluntários.	Leve dificuldade nessas atividades	Incapaz de funcionar independentemente nessas atividades, embora ainda possa engajar-se em algumas; parece normal à inspeção casual.	Nenhuma referência a funcionamento independente fora de casa. Parece estar bem para ser levado a atividades fora de ambiente familiar.	Nenhuma referência a funcionamento independente fora de casa. Parece estar muito doente para ser levado a atividades fora de ambiente familiar
Tarefas do Lar e Atividades de Lazer	Vida no lar, passatempos e interesses intelectuais bem mantidos.	Vida no lar, passatempos e atividades intelectuais levemente comprometidos.	Dificuldade leve mas evidente nas funções do lar; tarefas mais difíceis abandonadas; passatempos e interesses mais complexos abandonados.	Somente tarefas simples preservadas, interesses muito restritos e mal sustentados.	Sem função significativa em casa.
Autocuidado	Plenamente capaz para o autocuidado.		Necessita estímulo.	Requer ajuda para vestir-se, higiene e cuidado com objetos pessoais.	Requer muita ajuda para o cuidado pessoal, incontinência freqüente.

Inventário Neuropsiquiátrico

(Cummings et al – 1994)

- Responder baseando-se nas mudanças que ocorreram desde que o paciente começou a ter problemas de memória
- Marcar sim apenas quando o sintoma estiver presente. Do contrário, marcar não.
- Responda honestamente e meticulosamente às questões

Total: /144 pontos

Delírios				O paciente acredita que alguém está tentando rouba-lo ou prejudica-lo?															
Sim	Não	NA		Frequência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3	Estresse	0	1	2	3	4	5
Alucinações				O paciente age como se escutasse vozes? Fala com pessoas que não existem?															
Sim	Não	NA		Frequência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3	Estresse	0	1	2	3	4	5
Agitação/ Agressividade				O paciente é teimoso e rejeita ajuda dos outros? Tem períodos que se recusa a cooperar?															
Sim	Não	NA		Frequência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3	Estresse	0	1	2	3	4	5
Depressão/ Disforia				O paciente age como se estivesse triste ou de "baixo astral"? Refere sentir-se triste ou deprimido?															
Sim	Não	NA		Frequência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3	Estresse	0	1	2	3	4	5
Ansiedade				O paciente fica agitado quando se separa de você? Ele apresenta sinais de nervosismo, preocupado, assusta-se por razões não aparentes? Parece muito tenso ou irrequieto?															
Sim	Não	NA		Frequência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3	Estresse	0	1	2	3	4	5
Elação/ Euforia				O paciente parece animado demais ou excessivamente feliz – sem razão? Acha graça onde outros não acham?															
Sim	Não	NA		Frequência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3	Estresse	0	1	2	3	4	5
Apatia/ Indiferença				O paciente parece menos interessado em suas atividades habituais ou nas atividades e planos dos outros?															
Sim	Não	NA		Frequência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3	Estresse	0	1	2	3	4	5
Desinibição				O paciente parece agir impulsivamente? Ex, diz coisas que podem magoar as pessoas sem qualquer constrangimento ou fala abertamente coisas íntimas que em geral não se diz em público? Tira a roupa em frente de outras pessoas/ público – momentos não apropriados?															
Sim	Não	NA		Frequência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3	Estresse	0	1	2	3	4	5
Irritabilidade/ Labilidade				O paciente é impaciente e mau-humorado? Ele tem dificuldades para lidar com atrasos ou para ficar esperando algo que esteja programado? Seu humor é instável?															
Sim	Não	NA		Frequência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3	Estresse	0	1	2	3	4	
Distúrbios Motores				O paciente fica fazendo coisas repetitivas, como lidar andando ao redor da casa, mexendo nos botões da roupa, enrolando um cordão ou fazendo outras coisas repetitivamente? Anda sem motivo aparente?															
Sim	Não	NA		Frequência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3	Estresse	0	1	2	3	4	5
Comportamentos Noturnos				O paciente acorda você a noite, acorda muito cedo, cochila muito durante o dia? Tem dificuldade para dormir? Ele levanta à noite (não contar vezes que levanta p/ urinar e volta a dormir imediatamente)? Anda ao acaso à noite, veste-se ou perturba seu sono?															
Sim	Não	NA		Frequência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3	Estresse	0	1	2	3	4	5
Apetite e alimentação				O paciente perdeu ou ganhou peso? Mudou o gosto pelos alimentos?															
Sim	Não	NA		Frequência	1	2	3	4	Severidade	1	2	3	Estresse	0	1	2	3	4	5

FREQUENCIA

- 1 – ocasionalmente – menos que 1X/sem
- 2 – Algumas vezes – cerca de 1X/sem
- 3 – Frequentemente – várias vezes, menos que todos os dias
- 4 – Muito frequentemente – 1 ou + vezes/ dia

SEVERIDADE

- 1 – Leve – presente, mas produzindo pouca aflição no paciente
- 2 – Moderada – aflitiva e perturbadora
- 3 – Marcada – muito perturbadora

ESTRESSE DO CUIDADOR

- 0 = Nenhum
- 1 = Mínimo (levemente estressante, lidar com a situação não chega a ser um problema)
- 2 = Leve (não muito estressante, geralmente fácil de lidar com a situação)
- 3 = Moderado (razoavelmente estressante, nem sempre fácil de lidar com a situação)
- 4 = Importante (muito estressante, difícil de lidar com a situação)
- 5 = Muito importante (extremamente estressante, incapaz de lidar com a situação)

Índice de Katz para Atividades de Vida Diária

(Katz, S; Down, TD; Cash, HR et al – 1970)

Banho	I - Independente – não necessita de auxílio A - Auxílio – recebe assistência para banhar uma parte do corpo (dorso/pernas) D - Dependente - necessita que alguém o banhe
Vestuário	I - Alcança as roupas e se veste sem auxílio A - Necessita de auxílio apenas para amarrar sapatos D - Necessita de auxílio para alcançar as roupas, para se vestir – do contrário não se veste completamente ou permanece totalmente despido
Uso de sanitário	I - Consegue chegar ao banheiro, usa o sanitário, e recoloca o vestuário sem auxílio (pode usar equipamento auxiliar como bengala, cadeira de roda, usar comadre e esvaziar pela manhã) A - Necessita de auxílio para ir até o banheiro, ou para sua higienização/ recomposição do vestuário após uso do sanitário/ ou no uso de comadre D - Não usa o banheiro para eliminações
Transferência	I - Independente (cama/ cadeira)– pode necessitar de bengala, andador. A - Necessita de ajuda para sentar-se/ deitar-se/ levantar-se D - Não sai da cama
Continência	I - Tem controle de esfíncter vésico – intestinal A - Apresenta “acidentes ocasionais” – perder urina/ conteúdo fecal ocasionalmente D - Necessita de auxílio para o controle urinário/intestinal; uso de SVD; incontinência
Alimentação	I - Se alimenta sem auxílio A - Se alimenta sozinho, mas necessita de assistência para cortar os alimentos ou passar manteiga no pão. D - Necessita de auxílio para alimentar-se; usa SNG/SNE; Soroterapia/ Nutrição parenteral.

I = 1 ponto; A = 0,5 e D = 0 ponto

TOTAL: _____/6

Avaliação de Parkinsonismo (Adaptado de Tanner et al, 1990)

	SIM	NÃO
1. Tinha dificuldade para se levantar de uma cadeira?		
2. Notou se a letra (escrita) ficou pequena, se reduziu de tamanho?		
3. Notou ou alguém comentou se a sua voz estava mais baixa ou mais fraca que era antes?		
4. Tinha alterações do equilíbrio ao caminhar?		
5. Os pés ficavam presos ou agarrados no chão ao atravessar portas?		
6. Acha o seu rosto ficou mais “parado”, menos expressivo do que era antes?		
7. Tinha tremores nos braços ou nas pernas?		
8. Tinha dificuldades de abotoar as roupas?		
9. Arrastava os pés ou dava passos curtos ao caminhar?		

Não Aplicável Park: _____

ESCALA DE ATIVIDADES INSTRUMENTAIS DA VIDA DIÁRIA (IADL)
(Lawton & Brody)

A – Habilidade para usa o telefone 1. Utiliza o telefone por iniciativa própria 2. Disca alguns números conhecidos 3. Atende mas não faz ligações 4. Não usa o telefone de modo algum	1 1 1 0	E – Lavanderia 1. Lava completamente as roupas 2. Lava pequenas peças: meias, etc 3. Toda a roupa deve ser lavada por terceiros	1 1 0
B – Compras 1. Faz compras independente/e 2. Faz pequenas compras independente/e 3. Precisa ser acompanhado nas compras 4. Incapaz de fazer compras	1 0 0 0	F – Transporte 1. Usa independentemente transportes públicos ou dirige seu próprio carro 2. Chama de táxi, mas não usa transporte público 3. Usa transporte público se acompanhado 4. Locomove-se limitadamente de táxi ou carro com auxílio de outros 5. Não sai de casa/ Não usa nenhum transporte	1 1 1 0 0
C – Preparo de alimentos 1. Planeja, prepara e serve adequadamente as refeições independentemente 2. Prepara adequadamente as refeições se alguém lhe fornecer os ingredientes 3. Aquece, serve e prepara refeições, mas não garante uma dieta adequada 4. Necessita que alguém prepare e sirva a refeição	1 0 0 0	G – Medicação 1. É responsável por tomar sua medicação em dose e horários corretos 2. Assume responsabilidade por tomar sua medicação se separada anteriormente por outros 3. Não é capaz de tomar sua medicação	1 0 0
D – Tarefas domésticas 1. Mantem a casa sozinho ou com auxílio ocasional (p.ex: auxílio para tarefas pesadas) 2. Realiza tarefas diárias leves, como lavar louça, fazer a cama 3. Realiza tarefas diárias leves, mas não consegue fazê-las dentro dos padrões de limpeza 4. Necessita de auxílio com todas as tarefas domésticas 5. Não faz/ participa de nenhuma tarefa doméstica	1 1 1 1 0	H – Finanças 1. Controla suas finanças independentemente (conta de banco, talão de cheque, preenche cheques, paga contas) 2. Controla contas no dia a dia, mas necessita de auxílio com banco, compras maiores,... 3. Incapaz de controlar finanças	1 1 0

Lawton,MP; Brody, EM - The instrumental activities of Daily Living Scale. Gerontologist, 1969, 9: 179 - 186

Total: _____ / 8 pontos

Perguntas adicionais:

Ele(a) esquece panela no fogo, torneira aberta ou ferro ligado?
Ele(a) pode ser deixado(a) em casa sozinho(a) de forma segura?

Episódio Maior Depressivo no Passado – SCID

Critérios para classificar como depressão maior: Cinco (ou mais) dos seguintes critérios presentes durante período maior ou igual a duas semanas, sendo que um dos cinco deve ser ou (1) humor deprimido, ou (2) perda do interesse ou prazer.

1) Já houve, pelo menos uma vez na vida dele(a), algum momento em que se sentiu deprimido(a), ou na pior na maior parte do dia, quase todos os dias? (Como é que foi isso?)

SE SIM: Durou mais que duas semanas? SIM () NÃO ()

Critério: 1 2 3

2) Naquele tempo ou em outro momento, ele(a) perdeu o interesse ou o prazer pelas coisas que costumava gostar? (Como é que foi isso?) Isso acontecia quase todos os dias?

SE SIM: Durou mais que duas semanas? SIM () NÃO ()

Critério: 1 2 3 ? Quando foi isso?

3) Naquele período ele(a) perdeu ou ganhou peso? Ele(a) estava tentando perder peso?

SE NÃO: Como estava o apetite dele(a)? (Tinha que forçar para comer? Comia menos/mais que o habitual? Isso acontecia quase todos os dias?)

Critério 1 2 3 ? Assinalar: Perda de peso ou redução do apetite _____ Ganho de peso ou aumento do apetite _____

4) Como estava o sono dele(a)? (Dificuldade para dormir, acordando freqüentemente, dificuldades em ficar acordado, acordando muito cedo, ou, dormindo demais? Quantas horas por noite comparado com o habitual? Isso acontecia quase todas as noites?)

Critério: 1 2 3 ? Assinalar: Insônia _____ Hipersônia _____

5) Ele(a) estava tão inquieto(a) ou agitado(a) que não era capaz de ficar parado(a)? (Isso acontecia todos os dias?)

SE NÃO: E o contrário: falando e se movendo mais devagar do que o normal dele(a)? (Isso acontecia todos os dias?)

Critério: 1 2 3 ? Assinalar: agitação psicomotora _____ retardo psicomotor _____

6) Como estava a energia dele(a)? (Cansado(a) o tempo inteiro? Quase todos os dias?)

Critério: 1 2 3 ?

7) Como ele se sentia em relação a si mesmo? (Inútil, sem valor?) Quase todos os dias?

SE NÃO: Ele se sentia culpado por coisas que fazia ou deixava de fazer? Quase todos os dias?

Critério: 1 2 3 ? Assinalar: Sentimento de inutilidade _____ Culpa inadequada _____

8) Ele(a) tinha dificuldade para se concentrar ou pensar? (Com que tipo de coisas isso interferia?) Quase todos os dias?

SE NÃO: Era difícil para ele(a) tomar decisões sobre coisas do dia a dia? Quase todos os dias?

Critério: 1 2 3 ? Assinalar: Capacidade de pensar diminuída _____ Indecisão _____

9) As coisas estavam tão ruins que ele(a) pensava muito em morte ou que estaria em melhor situação se estivesse morto(a)? E quanto a se ferir?

Critério: 1 2 3 ? Assinalar: Pensamentos de morte recorrentes _____ Ideação suicida _____ Tentativa de suicídio _____

10) Durante aquele tempo ficou difícil para ele(a) trabalhar, cuidar das coisas em casa, ou se relacionar com as pessoas?

SIM () NÃO ()

11) Pouco antes de tudo isso começar ele estava bebendo em excesso ou usando drogas? SIM () NÃO ()

12) Pouco antes disso começar ele estava fisicamente doente? SIM () NÃO ()

13) Isso começou logo depois de alguém próximo a ele(a) morrer? SIM () NÃO ()

Durou mais que 2 meses? SIM () NÃO ()

OBS: Houve algum outro episódio de depressão na vida do paciente? () SIM () NÃO

Quando ocorreu (eram) ? _____

CONSIDERAR:

1 – ausente ou falso 2 – subliminar (duvidoso) 3 – limiar ou verdadeiro ? – informação inadequada

Episódio Maníaco no Passado - SCID

Critérios para classificar como mania no passado : Humor elevado e mais três dos outros sintomas, ou humor irritável e mais quatro dos outros sintomas.

HUMOR ELEVADO: Já houve algum período de tempo em que ele(a) estava se sentindo tão bem, agitado(a) ou excitado(a) que vocês perceberam que ele(a) não estava no seu normal? Ou ficava tão excitado(a) que se envolvia em problemas?

Critério 1 2 3 ?

Durou pelo menos 1 semana? Ou ele(a) teve que procurar um hospital? Sim () Não ()

Quando foi isso?

HUMOR IRRITÁVEL: Houve algum período em que ele(a) estava tão irritado(a), que era pego(a) gritando com as pessoas ou começando brigas ou discussões?

Durou mais que 1 semana? Ou ele(a) teve que procurar um hospital? Sim () Não ()

Critério: 1 2 3 ? Quando foi isso?

3) Naquele período como ele(a) se sentia em relação a si mesmo? (Mais confiante do que o habitual? Com algum poder ou habilidade especial?)

Critério 1 2 3 ?

4) Naquele tempo ele(a) tinha que dormir menos que o habitual? (Mesmo assim se sentia descansado?)

Critério: 1 2 3 ?

5) Naquele tempo ele(a) estava muito mais falante que o habitual? (Vocês tinham dificuldade para interromper ou entender o que ele(a) estava falando?)

Critério: 1 2 3 ?

6) Naquele tempo os pensamentos passavam rapidamente pela cabeça dele(a)?

Critério: 1 2 3 ?

7) Naquele tempo ele(a) era tão facilmente distraído(a) por coisas a sua volta que tinha dificuldades para se concentrar ou continuar o que estava fazendo?

Critério: 1 2 3 ?

8) Naquele período, como ele(a) passava o tempo? (Ele(a) se envolvia em tantas atividades a ponto de vocês ficarem preocupados?)

SE NÃO: Ele(a) estava fisicamente inquieto(a)? (Qual a intensidade disso?)

Critério: 1 2 3 ? Assinalar: aumento na atividade _____ agitação psicomotora _____

9) Naquele tempo, ele(a) fez alguma coisa que pudesse trazer problemas para ele(a) mesmo(a) ou para vocês (Comprando coisas que não precisava?) (Tendo comportamento sexual inadequado?)

Critério: 1 2 3 ?

10) Durante aquele tempo ficou difícil para ele(a) trabalhar, cuidar das coisas em casa, ou se relacionar com as pessoas?

SIM () NÃO ()

11) Pouco antes de tudo isso começar ele(a) estava bebendo em excesso ou usando drogas?

SIM () NÃO ()

12) Pouco antes disso começar, ele(a) estava fisicamente doente?

SIM () NÃO ()

CONSIDERAR:

1 – ausente ou falso 2 – subliminar (duvidoso) 3 – limiar ou verdadeiro ? – informação inadequada

Transtorno Obsessivo-Compulsivo (TOC)

Seu parente alguma vez apresentou:

- Medos, preocupações, idéias ou imagens repetitivos que causavam desconforto a ele(a)? (? 1 2 3)
- Comportamentos repetitivos (manias) que a pessoa tinha que fazer várias vezes e não conseguia evitar, tais como (**perguntar TODOS os itens de 1 a 9**):

- 1) Verificar fechaduras, fogão, se não se feriu ou feriu outros, ou perguntar se foi responsável por algo terrível que tenha acontecido (Agressão e verificação) (? 1 2 3) _____
- 2) Lavar excessivamente mãos e objetos, tomar banhos demorados, parecer preocupado com sujeira ou micróbios, com ficar contaminado e adoecer por isso, ter nojo de secreções do próprio corpo (Contaminação, limpeza e lavagem) (? 1 2 3) _____
- 3) Guardar objetos inúteis, manter o quarto ou casa entulhados (Colecionamento) (? 1 2 3) _____
- 4) Preocupação excessiva com: desrespeito a Deus; certo e errado; moralidade (Religião) (? 1 2 3) _____
- 5) Mania de arrumação, simetria, exatidão, perfeccionismo, ter que deixar as coisas organizadas do seu jeito (? 1 2 3) _____
- 6) Preocupação excessiva com doenças sem ser por contaminação, com partes do corpo, com a aparência física: (? 1 2 3) _____
- 7) Compulsões de repetição, reler ou reescrever várias vezes, repetir atividades rotineiras como entrar e sair de casa, levantar-se da cadeira, vestir roupas) (? 1 2 3) _____
- 8) Compulsões de contagem (contar telhas, tijolos, riscas do chão) (? 1 2 3) _____
- 9) Comportamentos extremamente supersticiosos (medo de passar perto de cemitérios, medo de gato preto, de números ou cores que representem azar). (? 1 2 3) _____

Qualquer um dos itens de 1 a 9 foi positivo? ? 1 3 ⇒

? ou 1= pule para **Transtornos de tiques**;
3=continue abaixo:

Você acha que seu parente gastava muito tempo por dia com esses sintomas? (? 1 2 3) _____

Quanto tempo? _____ (juntando tudo chegava a 1 hora por dia?) (? 1 2 3) _____

Os sintomas interferiam na vida dele? (? 1 2 3) _____

Causavam ansiedade, sofrimento? (? 1 2 3) Com que idade os sintomas começaram? _____

Transtornos de tiques

Tiques, também chamados de **sestos** ou **cacoetes**, são movimentos involuntários (que a pessoa faz sem querer), que geralmente começam na infância. Podem ser motores ou vocais. Os principais exemplos são (mostrar exemplos): piscar os olhos, fazer caretas, colocar a língua para fora, sacudir os ombros, sacudir a cabeça, fungar, pigarrear, assoviar, estalar etc.

1) A pessoa tinha tiques motores (? 1 2 3) Idade de início: _____ Tipos de tiques: _____

2) Tinha tiques vocais (? 1 2 3) Idade de início: _____ tipos de tiques: _____

Se **Não** para as respostas 1 e 2, passe para o próximo questionário. Se **Sim** para alguma das respostas:

Os tiques duraram mais de um ano? (? 1 2 3) _____

Os tiques duraram entre 3 meses e um ano? (? 1 2 3) _____

A pessoa tem tiques motores e vocais? (? 1 2 3) _____

Outras informações relevantes: _____

CLASSIFICAÇÃO SÓCIO ECONÔMICA
Associação Brasileira dos Institutos de Pesquisa de Mercado
(ABIPEME)

A- Em sua casa tem?

	NÃO	SIM	QUANTIDADE					
			1	2	3	4	5	6 ou +
Televisão			2	4	6	8	10	12
Empregada mensalista			6	12	18	24	24	24
Rádio			1	2	3	4	5	6
Banheiro			2	4	6	8	10	12
Aspirador de pó			5	5	5	5	5	5
Máquina de lavar			2	2	2	2	2	2
Automóvel de passeio			4	8	16	16	16	16

TOTAL: _____

B- Qual a instrução do chefe de família? (Quem é o chefe da família: _____)

Sem Instrução/ primário incompleto	0
Primário completo/ ginásio incompleto	1
Ginásio completo/ colegial incompleto	3
Colegial completo/superior incompleto	5
Superior completo	10

TOTAL: _____

CLASSE ABIPEME	
CLASSE	PONTOS
A	35 OU +
B	21 a 34
C	10 a 20
D	05 a 09
E	00 a 04

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :.....
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 (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **CORRELAÇÃO ANÁTOMO - FUNCIONAL DAS ALTERAÇÕES CEREBRAIS NO ENVELHECIMENTO:** *Um estudo quantitativo em material de necropsia*

2. PESQUISADOR: Lea Tenenholz Grinberg

CARGO/FUNÇÃO: Médica- pesquisadora INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 105290

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Patologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO X ☒

RISCO MÍNIMO ☐

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA :3 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

Muito obrigada por sua atenção.

Estamos realizando um estudo para identificar como o envelhecimento ocorre no cérebro. Este estudo é muito importante porque ainda não sabemos direito porque as pessoas têm demência ou ficam mais esquecidas ou tremendo. Este trabalho também irá ajudar a descobrir a causa de morte de seu parente. Tratamentos novos para as doenças só são descobertos fazendo estudos como este.

Este estudo irá funcionar da seguinte maneira:

O(a) Senhor(a) será entrevistado por um enfermeiro (a) à respeito de seu parente que faleceu. As perguntas são simples, porém é importante que o(a) senhor(a) pense por dois minutos antes de responder e que seja o mais exato possível. Caso não saiba a resposta, diga "não sei".

Durante a autópsia serão amostrados fragmentos de sistema nervoso central e de órgãos cujo comprometimento podem afetar a função cerebral, incluindo: coração, rim e carótidas. Esses fragmentos serão analisados com bastante cuidado e armazenados para estudos futuros nas áreas de anatomia, bioquímica, genética e imagem. Os resultados serão comparados com as respostas que o(a) senhor(a) respondeu. Não será feito nada a mais que o procedimento normal da autópsia e o corpo não será mutilado.

Com sua colaboração, poderemos saber se existiam alterações no cérebro de seu familiar que pudessem ser responsáveis por provocar doenças. Desta forma, outras pessoas poderão ser beneficiadas por conhecermos melhor doenças com Alzheimer e mal de Parkinson. Algumas das doenças passam de pai para filho e, além disso, podem afetar grande parte da população. Então, os resultados que conseguiremos poderão ajudar muitas pessoas a não ficarem doentes.

Não há nenhum risco neste estudo, porque o(a) senhor(a) não precisará voltar aqui novamente e este estudo não atrasará a realização da autópsia.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

Qualquer dúvida que o(a) senhor(a) tenha será esclarecida pela própria médica responsável pelo trabalho, os resultados estarão disponíveis somente a(o) senhor(a). A qualquer momento, se for sua vontade, o seu familiar pode ser retirado da pesquisa e todas as informações obtidas serão sigilosas. Uma cópia deste documento será entregue a(o) senhor(a).

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO

A responsável pela pesquisa em caso de dúvidas é,

Dra. Lea Tenenholz Grinberg

CRM-SP: 105290

Telefone: (011) 3066 7322

VI - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 200 . Horário do término: _____

assinatura do participante da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)