



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO REITOR JOÃO DAVID FERREIRA LIMA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

Gisele Espíndola

**Perfil do metabolismo da tetraidrobiopterina como  
biomarcador da esclerose lateral amiotrófica**

Florianópolis  
2022

Gisele Espíndola

**Perfil do metabolismo da tetraidrobiopterina como biomarcador da esclerose lateral amiotrófica**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Ciências Médicas  
Orientadora: Profa. Alexandra Susana Latini, Dra.  
Coorientadora: Profa. Katia Lin, Dra.

Florianópolis  
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Espindola, Gisele  
Perfil do metabolismo da tetraidrobiopterina como  
biomarcador da esclerose lateral amiotrófica / Gisele  
Espindola ; orientadora, Alexandra Susana Latini,  
coorientadora, Kátia Lin, 2022.  
147 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Ciências Médicas-Novo, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Ciências Médicas-Novo. 2. Doença do neurônio motor. 3.  
BH4. 4. Neopterin. 5. Marcador Biológico. I. Latini,  
Alexandra Susana. II. Lin, Kátia. III. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Médicas-Novo. IV. Título.

Gisele Espíndola

**Perfil do metabolismo da tetraidrobiopterina como  
biomarcador da esclerose lateral amiotrófica**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca  
examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Alexandra Susana Latina, Dra.  
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Ylmar Correa Neto, Dr.  
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Mário Emílio Teixeira Dourado Júnior, Dr.  
Instituição Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi  
julgado adequado para obtenção do título de mestre em Ciências Médicas.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Profa. Alexandra Susana Latini, Dra.  
Orientadora

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado à minha querida família e aos indivíduos portadores de esclerose lateral amiotrófica.

## **AGRADECIMENTOS**

Todos os momentos destinados à pesquisa científica me proporcionaram inúmeras reflexões que confirmaram a importância da essência da vida, da amizade, do amor ao próximo, da busca do algo novo, e especialmente o sentimento de gratidão, por aqueles que agradeço de coração a concretude dessa dissertação.

Aos indivíduos portadores de esclerose lateral amiotrófica - ELA e seus respectivos familiares bem como aos voluntários do grupo controle em compreenderam a importância da presente pesquisa;

À minha orientadora professora Dra. Alexandra Latini, por demonstrar a amplitude e importância da pesquisa científica de uma forma especial, como também pela sua amizade, por sua dedicação, comprometimento e resiliência comigo ao longo de todos os nossos encontros do mestrado;

À minha coorientadora, professora Dra. Katia Lin, pela sua amizade, em me instigar a adentrar no programa de pós-graduação, e por buscar incansavelmente a ampliação dos serviços da neurologia no HU;

Aos membros do Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo - LABOX, da UFSC, por sempre estarem dispostos a ajudar na realização das atividades inerentes a pesquisa. Meus agradecimentos a toda a equipe;

À Cida por ajudar na coleta dos exames laboratoriais;

À Secretaria de Estado da Saúde - SES, através da diretoria de assistência farmacêutica – DIAF, tal como aos farmacêuticos, por contribuírem com a publicização da realização da presente pesquisa junto aos portadores de ELA;

À empresa norte-americana Invitae® por oportunizar a distribuição e utilização gratuitamente do painel das principais mutações gênicas aos indivíduos portadores de ELA;

Ao primeiro grupo multidisciplinar de pesquisa em ELA do HUPEST, formado por Karen, Rachel, Rosemeri e Marina por impulsionarem os primeiros passos para esta pesquisa;

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Alexandra Susana Latini, Prof. Dr. Mário Emílio Teixeira Dourado Júnior, Dr. Pablo Brea Winckler, prof. Dr. Ylmar Correa Neto e Profa. Dra. Rosemeri Maurici da Silva, que gentilmente aceitaram participar da banca;

Ao amigo e professor Dr. Roque Alberto Sánchez Dalotto, por todo auxílio na construção dos mapas cartográficos do estado de Santa Catarina utilizados nessa dissertação;

Aos meus pais Marcelina e Gregório, por se dedicarem aos cuidados das minhas filhas Catarina e Cecília, enquanto estava coletando dados e trabalhando nesta pesquisa, e nos momentos intermináveis da escrita da dissertação;

Ao meu marido Pablo, pela sua paciência, companheirismo e toda ajuda prestada durante todo o mestrado, como as minhas filhas, por compreenderem as minhas ausências em função do trabalho e do mestrado. Foi por e com vocês que eu cheguei neste momento. Amo vocês;

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

"Não considere nenhuma prática como imutável. Mude e esteja pronto a mudar novamente. Não aceite verdade eterna. Experimente."

Skinner, Burrhus Frederic. 1904-1990



## RESUMO

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa progressiva multifatorial que afeta os neurônios motores superiores e inferiores, mostrando uma grande variabilidade clínica. A fisiopatologia da ELA ainda não se encontra completamente definida, o que tem comprometido o diagnóstico preciso e o desenvolvimento de terapias seguras e efetivas para curar ou para mudar o curso da doença. Ainda, não existe nenhum marcador quantitativo específico que possa identificar a ELA antes da severa sintomatologia estar instalada, quando de fato é difícil reverter o processo neurodegenerativo. Este trabalho teve por objetivo identificar se o metabolismo da tetraidrobiopterina (BH4), via metabólica essencial para vários processos celulares, incluindo neurotransmissão e atividade vascular, pode identificar indivíduos acometidos por ELA. A neopterinina é um metabólito estável derivado do metabolismo de BH4 que pode ser quantificado em fluídos biológicos. Trinta e sete participantes acometidos por ELA foram recrutados para participar neste estudo translacional prospectivo e transversal. Os participantes se encontravam em acompanhamento clínico no hospital universitário Polydoro Ernani de São Thiago – HUPEST ou foram convidados através da lista dos pacientes acometidos por ELA que utilizavam medicamento riluzol, gerenciada pela diretoria de assistência farmacêutica – DIAF, vinculada à secretaria do estado da Saúde de Santa Catarina. Com o intuito de confrontar os valores de neopterinina plasmática de indivíduos acometidos por ELA com um grupo controle de voluntários sadios pareados por sexo e idade (n= 18) também convidados a participar do estudo. A caracterização clínica e demográfica dos participantes afetados por ELA mostrou que esta amostra populacional do estado de Santa Catarina se comportou muito similar àquelas descritas no Brasil e no mundo. Embasados na análise realizada deste estudo, pôde-se demonstrar os preditores clínicos de duração de tempo entre o início dos sintomas até o diagnóstico, com maior atraso diagnóstico naqueles indivíduos com idades mais jovens ao início dos sintomas [ $r = -0,48$ ;  $p < 0,05$ ]. Nesta mesma vertente, o preditor de pior qualidade de vida esteve relacionado com a escala de funcionalidade [ $r = -0,85$ ;  $p < 0,001$ ], realçando recomendações de aspectos de suma relevância para a prática clínica. No que se refere aos valores de neopterinina no plasma, foram observadas concentrações reduzidas na maioria dos indivíduos com ELA, e só quatro participantes mostraram valores aumentados de 2 a 6 vezes quando comparados com o valor máximo observado no grupo controle (4,9 nmol/L). Após estes valores serem identificados como *outliers* e retirados da análise estatística paramétrica, pôde ser observado uma redução significativa nas concentrações plasmáticas de neopterinina nos participantes afetados por ELA [ $t_{(49)} = 3,22$ ;  $p < 0,01$ ]. Ainda, os valores de neopterinina correlacionaram significativamente com as subescalas clínicas de tronco da ALSFRS-R/BR [ $r = 0,34$ ;  $p < 0,05$ ] e subescala mobilidade (ALSAQ-40/BR) [ $r = -0,40$ ;  $p < 0,05$ ]. Uma única mutação genética patogênica no gene *FUS* foi encontrada em um participante afetado por ELA, mas não foi diferenciado pelos valores de neopterinina plasmática. Considerando que existiu correlação clínica significativa com os valores de neopterinina no plasma, foi analisada a sensibilidade e especificidade deste metabólito como um potencial biomarcador da doença. A análise da curva operacional (ROC) mostrou que as concentrações plasmáticas de neopterinina permitem classificar com sensibilidade e especificidade indivíduos acometidos por ELA, comparado com o grupo de voluntários sadios [área sob a curva, AUC= 0,82;  $p < 0,01$ ]. Finalmente, a neopterinina não mostrou correlação com sexo ou idade como previamente reportado

na literatura. Este trabalho permite propor a determinação dos níveis de neopterin plasmática como um potencial biomarcador da presença e da gravidade da ELA.

**Palavras-chave:** doença do neurônio motor; BH4; neopterin; marcador biológico; estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a multifactorial progressive neurodegenerative disease that affects upper and lower motor neurons, showing high clinical variability. The pathophysiology of ALS is not yet fully understood, which has compromised the diagnostic and the development of safe and effective therapies to cure or change the course of the disease. Still, there is no quantitative marker that can specifically and sensitively identify ALS before severe symptoms are set in, when it is difficult to reverse the neurodegenerative process. This study aimed to identify whether the tetrahydrobiopterin (BH4) metabolism, a metabolic pathway essential for several cellular processes, including neurotransmission and vascular activity, can identify individuals affected by ALS. Neopterin is a stable metabolite derived from BH4 metabolism that can be quantified in biological fluids. Thirty-seven ALS participants were recruited to participate in this prospective, cross-sectional translational study. Participants were undergoing clinical follow-up at the university hospital Polydoro Ernani de São Thiago – HUPEST, and they were invited through the list of patients affected by ALS who were using riluzole medication, managed by the pharmaceutical assistance board – DIAF, linked to the State Department of Health from Santa Catarina. In order to compare the plasmatic neopterin values in individuals affected by ALS, a group of healthy volunteers matched by sex and age (n= 18) were also invited to enroll this study. The clinical and demographic characterization of the participants affected by ALS showed that this cohort from the state of Santa Catarina had many similarities to the descriptions found in Brazil and worldwide. Based on the analysis performed in this study, it was possible to demonstrate the clinical predictors of time duration between onset of symptoms and diagnosis [ $r = -0,48$ ;  $p = 0,02$ ], with greater diagnostic delay in those individuals who started symptoms with those with younger ages at onset of the symptoms. In this way, the predictor of worse quality of life was related to the functionality scale [ $r = -0,85$ ;  $p < 0,001$ ], highlighting recommendations of aspects of paramount relevance for clinical practice. Regarding plasma neopterin values, reduced concentrations were observed in most subjects with ALS. Only four participants showed increased values from 2 to 6 times when compared to the maximum value observed in the control group (4.9 nmol/L). After these values were identified as outliers and removed from the statistical analysis, a significant reduction in neopterin plasma concentrations could be observed in participants affected by ALS [ $t(49) = 3.22$ ;  $p < 0.01$ ]. Furthermore, neopterin values correlated significantly with ALSFRS-R/BR clinical upper body subscales [ $r = 0.34$ ;  $p < 0.05$ ] and mobility subscale (ALSAQ-40/BR) [ $r = -0.40$ ;  $p < 0.05$ ]. A single pathogenic genetic mutation in the *FUS* gene was found in a participant affected by ALS, but it was not differentiated by plasma neopterin values. Considering that there was a significant clinical correlation with plasma neopterin values, the sensitivity and specificity of this metabolite as a potential biomarker of the disease was analyzed. The analysis of the operating curve (OC) showed that plasma concentrations of neopterin allow a sensitive and specified classification of individuals affected by ALS, compared with the group of healthy volunteers [area under the curve, AUC= 0.82;  $p < 0.01$ ]. Finally, neopterin showed no correlation with sex or age as previously reported in the literature. This work allows us to propose the determination of plasma neopterin levels as a potential biomarker of the presence and severity of ALS.

**keywords:** motor neuron disease; BH4; neopterin; biological marker; oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Vias metabólicas envolvidas na síntese de tetraidrobiopterina (BH4). As concentrações intracelulares de BH4 são mantidas fisiologicamente através da ação das vias metabólicas *de novo*, de salvação e de reciclagem. GTP (guanosina trifosfato); GTPCH (guanosina trifosfato ciclohidrolase I); PTPS (6-piruvil tetraidropterina sintase); SPR (sepiapterina redutase); BH2 (7,8-dihidrobiopterina); DHFR (dihidrofolato redutase); PCD (pterina 4a-carbinolamina desidratase); qBH2 (q dihidrobiopterina); DHPR (dihidropteridina reductase). .....33
- Figura 2 - Número e distribuição dos indivíduos por município do estado de Santa Catarina em uso de riluzol entre os anos de 2010 a 2021. ....44
- Figura 3 - Fluxograma do processo de recrutamento de participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica no estado de Santa Catarina. ....45
- Figura 4 - Indivíduos diagnosticados com esclerose lateral amiotrófica (ELA) em uso de riluzol de acordo com a base de dados da DIAF (diretoria de assistência farmacêutica). No mapa se apresenta o número de indivíduos em uso de riluzol entre os anos de 2010 a 2021, e a distribuição geográfica por município do estado de Santa Catarina.....46
- Figura 5 - Indivíduos diagnosticados com esclerose lateral amiotrófica (ELA) em uso de riluzol de acordo com a base de dados de à diretoria de assistência farmacêutica (DIAF). No mapa se apresenta o número de indivíduos em uso de riluzol no período 01/01/2020 a 25/10/2021, e a distribuição geográfica por município do estado de Santa Catarina. ....50
- Figura 6 - Distribuição regional dos participantes de estudo afetados por esclerose lateral amiotrófica no Estado de Santa Catarina. O maior percentual de participantes proveio da mesorregião da Grande Florianópolis, principalmente pelo município de Florianópolis, seguido das mesorregiões do Vale do Itajaí e do Sul Catarinense. Os números dentro do círculo vermelho representam os participantes recrutados através da diretoria de assistência farmacêutica (DIAF), enquanto aqueles dentro do círculo em verde, representam os participantes que se encontravam em acompanhamento clínico regular no ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HUPEST), da Universidade Federal de Santa Catarina. ....66
- Figura 7 - Instrumentos de avaliação clínica em participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica utilizando o mapa de calor com escala de cor contínua. O mapa de calor foi gerado pelo GraphPad Prism 9, utilizando os valores de correlação  $r$  de Pearson após a análise estatística. Valores de 1 representam a máxima correlação positiva; valores de -1 representam a máxima correlação negativa, ou inversa. ALSFRS= escala de avaliação funcional revisada da ELA para a língua portuguesa; Bulbar, Motor fino, Tronco e Respiratório são subescalas de divisão da escala ALSFRS-R/BR, ALSAQ-40= questionário de avaliação de qualidade de vida da ELA; Mobilidade, Atividades diárias, Alimentação e Comunicação são subescalas da escala ALSAQ-40/BR. ....75

Figura 8 - **A.** Concentrações de neopterinina no plasma de participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica (ELA) comparados com voluntários sadios (Controles), pareados por idade e sexo. Neste gráfico todos os dados observados foram considerados, incluindo os *outliers*. **B.** Concentrações de neopterinina plasmática após a retirada de quatro *outliers*, cujos valores se distanciaram do padrão da normalidade. \*\*  $p < 0,01$ , Controles vs. ELA, test  $t$  de Student. .... 79

Figura 9 - Curva operacional (ROC) que permite prever a presença de esclerose lateral amiotrófica (ELA) nos participantes do estudo com uma área sob a curva (AUC) de 0,82. AUC= 0,82 indica uma capacidade classificatória de 82 % de prever a presença da condição ELA. AUC com valores de 0,5 não apresenta poder preditor, e com valores de 1 representa um classificador perfeito. .... 81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Distribuição dos sujeitos de estudo de acordo com o município de residência no estado de Santa Catarina.....	47
Tabela 2 - Distribuição dos 222 indivíduos com ELA em uso de riluzol por município de domicílio no estado de Santa Catarina no período de 01/01/2020 a 25/10/2021.	51
Tabela 3 - Classificação do índice de massa corporal (IMC) segundo a Organização Mundial de Saúde .....	55
Tabela 4 - Descrição dos genes analisados nos participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica (ELA).....	59
Tabela 5 - Perfil sociodemográfico dos participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica (ELA).....	64
Tabela 6 - Características clínicas dos participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica (ELA).....	67
Tabela 7 - Distribuição dos critérios de Awaji-Shima e escala de estado de saúde da ELA (ALSHSS) de acordo com sexo e idade em participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica (ELA).....	70
Tabela 8 - Distribuição do fenótipo clínico quanto a sexo, idade e instrumentos de avaliação em em participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica (ELA).....	72
Tabela 9 - Distribuição da frequência de ingestão semanal de alimentos dos participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica (N = 33).....	73
Tabela 10 - Análise das correlações entre variáveis clínicas em participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica.....	74
Tabela 11 - Distribuição das variantes de significado incerto em participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica.....	76
Tabela 12 - Parâmetros bioquímicos-clínicos dos participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica .....	77
Tabela 13. Valores de neopterina plasmática no grupo de voluntários saudáveis (grupo controle) .....	80
Tabela 14 - Análise das correlações entre as concentrações de neopterina plasmática e instrumentos de avaliação clínica em participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica.....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1'-OXO-TP 1'-hidroxi-2'-oxotetrahydropterina  
AGMO Alquilglicerol Monooxigenase  
ALT Alanina Aminotransferase  
ALSAQ-40/BR questionário de avaliação de qualidade de vida da ELA  
ALSFRS-R/BR escala de avaliação funcional revisada da ELA para a língua portuguesa  
ALSHSS escala de estado de saúde da ELA  
ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
AMP Atrofia Muscular Progressiva  
AST Enzima Aspartato Aminotransferase  
ATP Adenosina - trifosfato  
AVD Atividade de Vida Diária  
BH2 7,8-Dihidrobiopetrina  
BH4 Tetraidrobiopetrina  
BHE Barreira Hematoencefálica  
*BiPAP* Bilevel positive pressure airway  
*C9orf72* Chromosome 9 Open Reading Frame 72  
CPK Creatinofosfoquinase ou Creatinoquinase  
COVID-19 (do Inglês, Coronavirus Disease 2019)  
CVF Capacidade Vital Forçada  
DFT Demência Frontotemporal  
DHFR Dihidrofolato Redutase  
DHPR Dihidropterina Redutase  
DIAF Diretoria de Assistência Farmacêutica  
DNA Ácido Desoxirribonucleico  
DTE Ditioeritritol  
EDTA Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético  
ENMG Eletroneuromiografia  
ELA Esclerose Lateral Amiotrófica  
ELA8 Esclerose Lateral Amiotrófica Subtipo 8  
ELISA Ensaio de Imunoabsorção Enzimática  
ELP Esclerose Lateral Primária  
FDA do Inglês *Food and Drug Administration*  
FUS *Fused In Sarcoma*  
GTP Guanosina Trifosfato  
GTPCH GTP Cicloidrolase I  
GCH1 Gene GTP Cicloidrolase I  
HUPEST Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago  
IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IL - 6 Interleucina-6  
IL - 98 Interleucina-98  
IL -  $\beta$  Interleucina-  $\beta$   
IMC Índice de Massa Corporal  
LABOX Laboratório Bioenergética e Estresse Oxidativo  
LCR Líquido Cefalorraquidiano  
LTP Potenciação de Longo Prazo  
MFFQ Questionário de Frequência Alimentar Mecanizada  
NM Neurônio Motor

NMI Neurônio Motor Inferior  
NMS Neurônio Motor Superior  
NOS Óxido Nítrico Sintase  
PCO2 Pressão Parcial do Gás Carbônico  
PCD Pterina-4 $\alpha$ -Carbinolamina Desidratase  
PCR Proteína C Reativa  
POP Procedimento Operacional Padrão  
PRNP Proteína Relacionada ao Prion  
PRKN Gene Parkin  
PTP 6-Piruvil Tetrahydropterina  
PTPS 6-Piruvil-Tetrahydropterina Sintase  
RNA Ácido Ribonucleico  
RNM Ressonância Nuclear Magnética  
SARS-CoV-2 (do Inglês, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2)  
SES Secretaria de Estado da Saúde  
SN Sistema Nervoso  
SNC Sistema Nervoso Central  
SOD1 Enzima Antioxidante Mitocondrial Superóxido Dismutase 1  
SPR Sepiapterina Redutase  
SR Seapterina Redutase  
TAP Tempo de Protrombina  
TARDBP *TAR DNA-Binding Protein*  
TCA Ácido Tricloroacético  
TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
TDP – 43 *TAR DNA-Binding Protein-43*  
Th1 Célula T *Helper* 1  
TNF $\alpha$  Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$   
TNF Receptor 1 Fator de Necrose Tumoral Receptor 1  
TSH Hormônio Tireoestimulante  
TTPA Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada  
UFSC Universidade Federal de Santa Catarina  
VAPB *Vesicle-associated membrane protein-associated protein B*  
VHS Velocidade de Hemossedimentação  
VUS Variante de Significado Incerto



## LISTA DE SÍMBOLOS

- % Percentagem
- < Maior que
- > Menor que

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>ESTADO DA ARTE</b> .....	<b>22</b>
2.1	DEFINIÇÃO DA DOENÇA.....	22
2.2	INCIDÊNCIA E PREVALÊNCIA .....	23
2.3	FISIOPATOLOGIA DA ELA.....	23
<b>2.3.1</b>	<b>Estresse oxidativo</b> .....	<b>24</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Excitotoxicidade do glutamato</b> .....	<b>24</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Neuroinflamação</b> .....	<b>25</b>
<b>2.3.4</b>	<b>Disfunção mitocondrial</b> .....	<b>26</b>
2.4	ASPECTOS CLÍNICOS DA ELA .....	27
2.5	COMPONENTE GENÉTICOS.....	28
2.6	TRATAMENTO MEDICAMENTOSO .....	30
2.7	DIETA E ELA.....	30
2.8	BIOMARCADORES.....	31
2.9	METABOLISMO DA BH4 .....	32
2.10	VIA <i>DE NOVO</i> DA BH4 .....	33
2.11	VIA DE SALVAÇÃO .....	34
2.12	VIA DE RECICLAGEM .....	34
2.13	CONSEQUÊNCIAS NA DEFICIÊNCIA DE BH4.....	35
2.14	EFEITOS DO EXCESSO DE BH4.....	36
2.15	EFEITOS DA BH4 E O SNC .....	37
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
4.1	OBJETIVO GERAL.....	40
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	40
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
5.1	DESENHO DO ESTUDO .....	42
5.2	POPULAÇÃO .....	42
5.3	SELEÇÃO DE PARTICIPANTES .....	42
<b>5.3.1</b>	<b>Participantes afetados por ELA</b> .....	<b>42</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Voluntários saudáveis</b> .....	<b>52</b>
5.4	CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE .....	53

<b>5.4.1</b>	<b>Critérios de inclusão</b> .....	<b>53</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Critérios de exclusão</b> .....	<b>53</b>
5.5	AVALIAÇÃO CLÍNICA E COLETA DE DADOS .....	53
<b>5.5.1</b>	<b>Aplicação de questionário</b> .....	<b>53</b>
<b>5.5.2</b>	<b>Aplicação de escalas</b> .....	<b>55</b>
5.5.2.1	<i>IMC</i> .....	55
5.5.2.2	<i>Critérios de Awaji-Shima</i> .....	55
5.5.2.3	<i>Escala ALSHSS</i> .....	56
5.5.2.4	<i>Escala ALSFRS-R/BR</i> .....	57
5.5.2.5	<i>Questionário ALSAQ-40/BR</i> .....	57
5.5.2.6	<i>Escala de sonolência diurna de Epworth</i> .....	57
5.5.2.7	<i>Questionário de frequência alimentar mecanizada (Mechanized food-frequency questionnaire – MFFQ)</i> .....	58
5.6	DETERMINAÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS NOS PARTICIPANTES DO ESTUDO .....	59
<b>5.6.1</b>	<b>Determinação dos exames genéticos</b> .....	<b>59</b>
<b>5.6.2</b>	<b>Determinação de parâmetros bioquímicos no sangue</b> .....	<b>61</b>
<b>5.6.3</b>	<b>Determinação das concentrações de neopterinina</b> .....	<b>61</b>
5.6.3.1	<i>Coleta das amostras</i> .....	61
5.6.3.2	<i>Preparação das amostras</i> .....	61
5.6.3.3	<i>Quantificação de neopterinina</i> .....	62
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	63
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>64</b>
6.1	PERFIL DOS PARTICIPANTES: CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL CLÍNICO E EPIDEMIOLÓGICO .....	64
6.2	CARACTERIZAÇÃO DOS DADOS CLÍNICOS .....	67
6.3	ANÁLISES DE MARCADORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS NOS PARTICIPANTES DO ESTUDO .....	75
<b>6.3.1</b>	<b>Mensuração dos exames genéticos</b> .....	<b>75</b>
6.3.1.1	<i>Mensuração de parâmetros bioquímicos no sangue</i> .....	77
<b>6.3.2</b>	<b>Mensuração das concentrações plasmáticas de neopterinina</b> ....	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>103</b>

<b>9</b>	<b>LIMITAÇÕES .....</b>	<b>105</b>
<b>10</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>107</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>108</b>
	<b>LISTA DE TRABALHOS CIENTÍFICOS GERADOS DURANTE O MESTRADO</b>	
	<b>.....</b>	<b>122</b>
	<b>APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....</b>	<b>124</b>
	<b>APÊNDICE B - Parecer Consubstanciado Do Cep .....</b>	<b>128</b>
	<b>APÊNDICE C - Questionário sobre o perfil clínico-epidemiológico dos</b>	
	<b>pacientes do ambulatório de doenças neuromusculares.....</b>	<b>131</b>
	<b>APÊNDICE D - Preparação, coleta e armazenamento das amostras de</b>	
	<b>sangue.....</b>	<b>135</b>
	<b>ANEXO A - Recomendações do consenso de Awaji-Shima para a aplicação</b>	
	<b>de testes eletrofisiológicos .....</b>	<b>140</b>
	<b>ANEXO B - Escala de Estado de Saúde da ELA (ALSHSS) .....</b>	<b>141</b>
	<b>ANEXO C - Escala de avaliação funcional da ELA (ALSFRS-R).....</b>	<b>142</b>
	<b>ANEXO D - Questionário de avaliação de qualidade de vida da ELA (ALSAQ-</b>	
	<b>40/BR).....</b>	<b>144</b>
	<b>ANEXO E - Escala de Sonolência de Epworth .....</b>	<b>145</b>
	<b>ANEXO F – Mechanized food-frequency questionnaire (MFFQ) .....</b>	<b>146</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença neurológica degenerativa progressivamente incapacitante, caracterizada por degeneração de neurônios motores superiores (NMS) e inferiores (NMI) do córtex motor, tronco encefálico e medula espinhal (BROWN; AL-CHALABI, 2017). A doença pode cursar com sintomas que incluem fraqueza e atrofia muscular, fadiga, espasticidade, fasciculações, disfagia, disartria, perda ponderal, insuficiência respiratória e deterioração das funções cognitivas. Embora rara, sua incidência global parece estar aumentando nos últimos anos, provavelmente decorrente do envelhecimento populacional (MATHIS *et al.*, 2019).

O diagnóstico costuma ser tardio, oneroso e demorado, ocorrendo quando há um comprometimento clínico avançado dos pacientes, tornando o diagnóstico mais desafiador por não contar com um biomarcador quantitativo que permita a identificação precoce da ELA. Ainda, a sobrevida média da ELA é de dois a cinco anos após o início dos sintomas, e até o momento não há um tratamento farmacológico efetivo para mudar o curso da doença ou curar a ELA. A 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH4) é um cofator enzimático obrigatório para o metabolismo de fenilalanina e de éteres lipídicos, e para a síntese de dopamina, serotonina e óxido nítrico.

Dados recentes mostram que a biossíntese de BH4 se encontra exacerbada em doenças crônicas que apresentam como componente fisiopatológico a inflamação, incluindo asma, esclerose múltipla, colite ulcerativa, artrite reumatoide, diabetes mellitus, deficiência cognitiva e Parkinson (CRONIN *et al.*, 2018; FUJITA *et al.*, 2020; PIRES *et al.*, 2020; TEGEDER *et al.*, 2006). Ainda, a neoptերina, que é um subproduto da via de síntese de novo da BH4 e é sintetizada em condições de estresse celular induzido por estímulos inflamatórios (FRANSCINI *et al.*, 2003; ISHII *et al.*, 2005), tem sido relacionada com o desenvolvimento e progressão de doenças com comprometimento neurológico, como a doença de Parkinson (WIDNER; LEBLHUBER; FUCHS, 2002). Por outro lado, sabe-se que a deficiência de BH4 e metabólitos relacionados provocam doenças neurológicas/neurodegenerativas e vasculares. Alguns exemplos de deficiências genéticas são a fenilcetonúria e a deficiência de GTP (guanosina trifosfato), ciclohidrolase I (GCH1) (distonia sensível a

levodopa), e de deficiências adquiridas, doenças cerebrovasculares e cardiovasculares. Neste cenário, nosso grupo de pesquisa tem demonstrado que além das funções tradicionais do metabolismo da BH4 na biologia celular, esta via metabólica possui funções antioxidante, anti-inflamatória, ativador da função mitocondrial e da memória. Dessa forma, considerando a importância do metabolismo da BH4 e sua relação com a presença e progressão de doenças neurológicas/neurodegenerativas, buscou-se investigar o papel do metabolismo da BH4 em fluídos biológicos de indivíduos acometidos por ELA.

## **2 ESTADO DA ARTE**

### **2.1 DEFINIÇÃO DA DOENÇA**

A ELA é uma doença neurodegenerativa de curso crônico e progressivo caracterizada por degeneração de NMS e NMI do córtex motor, tronco encefálico e medula espinhal (BYRNE *et al.*, 2013).

A ELA foi conhecida como doença de Charcot em homenagem ao médico francês Jean Martin Charcot que, dentre suas várias contribuições à neurologia, determinou em 1869 as características essenciais para o reconhecimento da ELA, além de ter sido o primeiro a relacionar os sintomas com o acometimento dos neurônios motores (NM) (ROWLAND; SHNEIDER, 2001).

A forma clássica da doença tem instalação insidiosa, caracterizada por fraqueza muscular assimétrica, atrofia de membros e língua, além de fasciculações e hiperreflexia. Progressivamente, pode apresentar sintomas bulbares caracterizados por disfonia, disartria e disfagia, além de sintomas respiratórios, cognitivos e alteração comportamental, resultando em incapacidade funcional (BROWN; AL-CHALABI, 2017).

Os pacientes acometidos por ELA apresentam uma sobrevida média de três a cinco anos após o início dos sintomas (YOKOI *et al.*, 2016). Contudo, há vários fatores que contribuem para a patogênese da ELA, o que faz com que a duração da doença possa chegar a superar os vinte anos (ONG; TAN; HOLBROOK, 2017).

Sabe-se que as maiores taxas de mortalidade estão associadas ao sexo masculino e a uma idade mais avançada de início da doença com predomínio bulbar (CHIÒ *et al.*, 2013).

## 2.2 INCIDÊNCIA E PREVALÊNCIA

A incidência da ELA nos países ocidentais é de 1 a 3 / 100.000 pessoas por ano, com predomínio em homens (0,8 a 2,7 homens por cada mulher afetada).

No Brasil não há dados acurados sobre a incidência e prevalência global no país, com pesquisas regionais com série de casos em vários centros, sendo as mais recentes em Porto Alegre (LINDEN-JUNIOR *et al.*, 2013), Minas Gerais (PRADO *et al.*, 2016) e uma nacional (COUTO *et al.*, 2021).

## 2.3 FISIOPATOLOGIA DA ELA

Até o presente momento não existe uma definição específica da fisiopatologia da ELA. Numerosos processos deletérios têm sido propostos de participar nos mecanismos moleculares da doença e estes incluem diversas formas de anormalidades celulares, incluindo deposição de proteína intranuclear e citosólica e agregados de RNA, distúrbios dos mecanismos de degradação de proteínas, como a alteração genética da proteína chamada enzima antioxidante mitocondrial superóxido dismutase 1 (SOD1), na qual foi possível descrever o mecanismo de estresse oxidativo e a sua relação com a morte neuronal, excitotoxicidade mediada por excesso de ativação do receptor de glutamato, disfunção mitocondrial, e ativação microglial (CIERVO *et al.*, 2017).

Na maioria dos casos, esses eventos ativam e recrutam células não neuronais (astrócitos, microglia e oligodendroglia), que exercem tanto efeitos benéficos como influências negativas na viabilidade do neurônio motor. Estas diversas anormalidades podem afetar diferencialmente os compartimentos subcelulares (dendritos, soma, axônios e junções) (BROWN; AL-CHALABI, 2017). De fato, início e progressão da degeneração do neurônio motor na ELA parece ser influenciado pela interação complexa entre diferentes tipos de

células, juntamente com o desenvolvimento de um meio inflamatório sustentado (FERRAIUOLO, 2014).

### 2.3.1 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo surge de um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade do sistema de remover ou reparar os danos causados e restaurar o ambiente redutor. Tal dano inclui alteração da conformação da proteína, alteração da membrana celular, dinâmica da oxidação de ácidos graxos insaturados e alterações nas espécies de DNA e RNA (BARBER; SHAW, 2010)

As ROS também podem ativar células gliais, resultando na exacerbação de ROS e de citocinas pró-inflamatórias que ativam células gliais vizinhas (KOUTSILIERI et al., 2002). O envolvimento glial pode, portanto, ser uma maneira pela qual a degeneração do neurônio motor, que muitas vezes começa focalmente, se espalha para populações de neurônios motores contíguos.

Vários estudos patológicos relataram evidências de aumento de estresse oxidativo em tecido *posmortem* de ELA (FERRANTE et al., 2002). De fato, estudos usando o líquido cefalorraquidiano (LCR) de indivíduos com ELA permitiram a medição de marcadores de estresse oxidativo em estágios mais precoces da doença, permitindo contar com esta informação antes dos estágios finais (BARBER; SHAW, 2010).

### 2.3.2 Excitotoxicidade do glutamato

O glutamato é um neurotransmissor excitatório que auxilia na transmissão sináptica de impulsos nervosos em neurônios motores (SPREUX-VAROQUAUX et al., 2002). Quando o equilíbrio entre liberação e recaptação de glutamato é perturbado ocorre excitotoxicidade, resultando em concentrações aumentadas de glutamato na fenda sináptica (BARBER; MEAD; SHAW, 2006). Essa situação resulta em estimulação excessiva de receptores glutamatérgicos, o que leva a aumento das concentrações intracelulares de cálcio, e lesão neuronal. Este ambiente também provoca a proliferação da astroglia e da



microglia, o acúmulo de material proteico, neurofilamentos, pigmentos e inclusões de ubiquitina, disfunção mitocondrial, estresse de retículo endoplasmático, defeito do trânsito nucleocitoplasmático, alterações de neuroexcitabilidade final e transporte axonal alterado (AL-CHALABI *et al.*, 2014). Níveis elevados de glutamato foram relatados em um subconjunto de indivíduos com ELA (SPREUX-VARQUAUX *et al.*, 2002). Além disto, quando os neurônios motores liberaram ROS no meio extracelular em concentrações suficientes para induzir a oxidação e romper a absorção do glutamato em astrócitos vizinhos, cria um ciclo vicioso de aumento de estresse oxidativo e excitotoxicidade que, em última análise, leva a degeneração do neurônio motor (BARBER; SHAW, 2010).

### 2.3.3 Neuroinflamação

A neuroinflamação tem sido consistentemente observada em regiões motoras do sistema nervoso central (SNC) na ELA, familiar e esporádica, constituindo uma marca da doença (LIU; WANG, 2017). Os astrócitos normais promovem um ambiente fisiológico para a função dos neurônios. No entanto, tem sido demonstrado que os astrócitos se tornam reativos e outros aberrantes, proliferam formando uma cicatriz, e liberam moléculas inibitórias que bloqueiam o crescimento de axônios danificados na ELA (BRETTSCHEIDER *et al.*, 2006; GHISONI *et al.*, 2015b). Tem sido reportado que neurônios motores saudáveis co-cultivados na presença de astrócitos aberrantes provocam a morte de 90 % de neurônios denotando assim um microambiente não permissivo para o crescimento de neurônios e diferenciação.

Neste contexto, biomarcadores de dano axonal, que incluem a presença da proteína tau, neurofilamentos de cadeia pesada e progranulina, estão aumentados no LCR de indivíduos com ELA (BRETTSCHEIDER *et al.*, 2006).

As células da microglia representam a primeira e principal forma de defesa imunológica ativa do SNC e pode ser ativado por qualquer tipo de desafio tóxico, incluindo lesão, infecção e isquemia. Após a ativação, eles aumentam, migram e podem se tornar fagocitários para remover matéria tóxica (FILIANO; GADANI; KIPNIS, 2015). As células microgliais ativadas secretam substâncias

pró-inflamatórias e neurotóxicas. Se as células da microglia não puderem resolver ou eliminar a citotoxicidade no SNC, elas permanecem reativas e continuam a recrutar astrócitos e oligodendrócitos, causando um processo inflamatório contínuo (PHILIPS; ROTHSTEIN, 2014). A presença de inflamação periférica também tem sido demonstrada na ELA, e sabe-se que o aumento de mediadores pró-inflamatórios no sangue também impactam negativamente no SNC. Numerosos grupos têm demonstrado maior produção e liberação de citocinas inflamatórias, incluindo interleucina 6 (IL-6) e fator de crescimento tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), bem como aumento da produção de ciclooxigenase-2 e prostaglandina E2 em cultura de astroglia em ratos (MISHRA *et al.*, 2016).

#### **2.3.4 Disfunção mitocondrial**

As mitocôndrias têm múltiplas funções que são essenciais para a sobrevivência do NM. Alterações na estrutura e função das mitocôndrias foram postulados como o evento central na fisiopatologia de diferentes doenças neurodegenerativas incluindo a ELA (SMITH; SHAW; DE VOS, 2019).

A disfunção do transporte de elétrons pode resultar em consumo alterado de oxigênio, aumento da geração de ROS e provocando estresse oxidativo (OBRADOR *et al.*, 2021). Este estado tem sido caracterizado por aumento de proteínas carboniladas, proteínas nitradas, disfunção de enzimas envolvidas na síntese de adenosina-trifosfato (ATP) e no reparo do DNA, entre outros, em neurônios motores espinhais obtidos de animais transgênicos (CARRIEDO *et al.*, 2000). Ainda, tem sido também reportado a existência de uma desregulação da dinâmica mitocondrial com excesso de fissão, levando a maior fragmentação mitocondrial em fibroblastos de indivíduos acometidos por várias formas familiares de ELA e em neurônios motores obtidos dos modelos experimentais desenvolvido em roedores para a mutação do gene SOD1 (ALMER *et al.*, 1999). Todos os processos deletérios mencionados acima, ainda podem provocar estresse sobre o retículo endoplasmático levando a uma desregulação da movimentação do cálcio, que é sabido que promove a neurodegeneração. As consequências potenciais incluem interrupção da atividade de complexos da cadeia respiratória, homeostase redox interrompida

e diminuição da produção de ATP. Além disso, a homeostase do cálcio pode ser interrompida e a apoptose pode ser ativada (PINGLE; TUMANE; JAWADE, 2008).

Embora seja geralmente aceito que a disfunção mitocondrial é uma alteração precoce na ELA, ainda não está claro se essa disfunção ocorre no início ou é apenas consequência de uma cascata de eventos patológicos que acabam por causar degeneração e morte de NM (SMITH; SHAW; DE VOS, 2019). Um estudo recente mostrou disfunção mitocondrial usando espectroscopia de ressonância magnética no cérebro e músculo de indivíduos acometidos por ELA (SASSANI *et al.*, 2020).

A morte celular apoptótica está ligada à disfunção mitocondrial e envolve a liberação de sinais de morte mitocondrial. Estes eventos foram também demonstrados em tecidos *postmortem* obtidos da medula de indivíduos com ELA (MARIN *et al.*, 2016).

#### 2.4 ASPECTOS CLÍNICOS DA ELA

Dependendo do grupo de neurônios afetados, a doença pode apresentar maior comprometimento bulbar, espinhal ou ambos (VAN ES *et al.*, 2017). A disfunção espinhal afeta a maioria dos pacientes, com cerca de 66 %, e, portanto, é definida como a forma clássica da ELA. Estes indivíduos podem apresentar maior comprometimento de NMS e NMI, com fraqueza e atrofia da musculatura apendicular, envolvimento restrito de membros superiores ou de membros inferiores, além de poder afetar músculos faciais (VAN ES *et al.*, 2017). Os pacientes com ELA com disfunção bulbar apresentam lesões na via córtico-bulbar ou no núcleo motor no tronco encefálico, regiões relacionadas à disfagia e complicações respiratórias, como atelectasias e broncoaspiração. Deve ser salientado que estas representam umas das maiores causas de morbidade e mortalidade na ELA, sendo determinantes da qualidade de vida dos afetados (FATTORI *et al.*, 2006; FREGONEZI *et al.*, 2015).

Além das formas clássicas, os fenótipos clínicos em pacientes com ELA podem ser classificados naqueles que apresentam predomínio motor, caracterizada pela manifestação atípica de sintomas motores e variabilidade

extramotora, incluindo deficiências cognitivas, sinais extrapiramidais, anormalidades do movimento ocular, podendo ainda ter disfunção autonômica (TAKEDA; KITAGAWA; ARAI, 2020).

A principal característica clínica da ELA está representada por fraqueza muscular progressiva que pode evoluir rápida ou lentamente, levando a fraqueza dos músculos inspiratórios e expiratórios e resultando em fadiga diafragmática, anormalidades espirométricas e alterações na ventilação voluntária máxima (CHANDRASOMA *et al.*, 2012; HADJIKOUTIS; WILES, 2001). A fraqueza muscular depende da gravidade e da carga mecânica imposta ao sistema ventilatório, culminando na principal causa de morte por falência respiratória hipercápnica (CHANDRASOMA *et al.*, 2012). Essa falência respiratória indica degeneração dos centros respiratórios centrais e neurônios motores comprometendo o nervo frênico. Contudo, a disfunção respiratória e apendicular tem grande impacto na qualidade de vida e sobrevida dos pacientes com ELA, e a quantificação destas auxilia, em parte, para avaliar a progressão da doença (ANDERSEN *et al.*, 2007).

## 2.5 COMPONENTE GENÉTICOS

As novas tecnologias para mapeamento de genes e análise genômica permitiram a identificação de mais de 120 variantes genéticas associadas a um risco maior de desenvolver ELA (BROWN; AL-CHALABI, 2017) e mais de 20 genes diferentes já foram implicados a ELA familiar, ELA esporádica ou ambas (JI *et al.*, 2017). Como exemplos, podem ser citadas a variante descrita no gene da enzima antioxidante mitocondrial SOD1 (ROSEN *et al.*, 1993) e expansão da repetição hexanucleotídica (GGGGCC) no gene *chromosome 9 open reading frame 72 (C9orf72)* (COOPER-KNOCK; SHAW; KIRBY, 2014).

No Brasil, um estudo recente divulgou (GONÇALVES *et al.*, 2021) que o gene VAPB foi responsável por 30 % das famílias estudadas, confirmando dados de estudo brasileiro de 2017 (CHADI *et al.*, 2017), o C9orf72 por 22 %, seguido do SOD1 em 7 % e o TARDBP com 5 % dos casos. Estes dados são distintos de estudos de coorte europeu e norte-americano que possuem as mais frequentes causas subjacentes nas mutações dos genes C9orf72, SOD1, TAR

DNA-Binding Protein 43 (TARDBP), *fused in sarcoma* (FUS) e Vesicle-Associated Membrane Protein-Associated Protein B (VAPB) (MEJZINI *et al.*, 2019).

Apesar da ausência de história familiar em ELA esporádica, estudos envolvendo gêmeos mostraram que a herdabilidade é de cerca de 60 % e mutações geralmente encontradas em ELA familiar são também encontradas em ELA esporádica (BROWN; AL-CHALABI, 2017). Isso pode ser explicado em parte pela dificuldade em identificar se os pacientes com doença de início tardio têm história familiar de ELA.

Por outro lado, algumas variantes genéticas, que, isoladamente, conferem um risco moderado ou baixo de desenvolver ELA, quando combinadas ou expostas a algum fator ambiental, potencializam-se para determinar a doença. Este tipo de situação é chamada de herança oligogênica, em que uma única variante genética não é suficiente para causar a doença, mas aumenta significativamente o risco quando combinado com um segundo fator (AL-CHALABI; VAN DEN BERG; VELDINK, 2017). A heterogeneidade genética associada a essas condições pode dificultar o uso do fenótipo como único critério para selecionar uma causa definitiva.

O teste genético pode ajudar a confirmar um diagnóstico clínico, prever o prognóstico e a progressão da doença, facilitar a detecção precoce de sintomas, orientar o planejamento familiar e o aconselhamento genético ou promover a inscrição em ensaios clínicos.

Dada a sobreposição clínica de algumas doenças como a demência hereditária e ELA, um painel genético pode promover uma avaliação eficiente de vários genes potenciais com base em uma única indicação clínica, analisando genes que possam estar associados a condições neurodegenerativas progressivas que afetam o sistema nervoso (SN), incluindo a ELA, demência frontotemporal (DFT), doenças de Alzheimer e de Parkinson.

Apenas 10 a 15 % dos casos são de origem familiar, sendo o restante considerado como casos esporádicos, o que tem levado a postular que fatores ambientais estariam contribuindo para a patogênese da doença (FEDDERMANN-DEMONT *et al.*, 2017).

## 2.6 TRATAMENTO MEDICAMENTOSO

Embora inúmeras terapias e agentes experimentais já tenham sido propostos como estratégias farmacológicas promissoras na ELA, os resultados têm sido frustrados, tanto na cura quanto no retardo efetivo da progressão da doença.

O riluzol é o único medicamento licenciado no Brasil que afeta o curso da ELA e tem somente um efeito modesto na sobrevivência (ONG; TAN; HOLBROOK, 2017). O uso de riluzol tem demonstrado estender a vida útil em 2 a 3 meses (RIVIERE *et al.*, 1998).

Um novo medicamento com efeitos antioxidantes chamado edaravone foi aprovado pela agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, FDA (*Food and Drug Administration*) em maio de 2017. Este medicamento já vinha sendo usado no Japão em pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico agudo e em pacientes com ELA de fase inicial, com a finalidade de manutenção da função e qualidade de vida em pacientes no estágio inicial com diagnóstico definitivo ou provável de ELA (ABE *et al.*, 2017), que, conseqüentemente, compromete o desenvolvimento de uma terapia efetiva.

Uma nova medicação, ainda não aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o fenilbutirato de sódio-taurursodiol (PAGANONI *et al.*, 2021) mostrou um retardo significativo no declínio funcional e aumento na sobrevida de pacientes com ELA apresentando média de sobrevida de 6,5 meses mais longa em comparação ao placebo.

## 2.7 DIETA E ELA

Sabendo das dificuldades encontradas na deglutição e alimentação destes pacientes, a utilização de questionários de frequência alimentar, um tipo de instrumento de avaliação dietética do consumo alimentar habitual de um indivíduo, relacionado à frequência com o entrevistado consumiu itens alimentares, com base em uma lista de alimentos pré-definida, pode ser utilizada

no intuito de compreender a relação entre padrões de consumo e condições de saúde.

Além disto, as listas de alimentos incluídas nestes questionários são culturalmente específicas, e, em geral, são adaptados e validados para uso em diferentes contextos (KIRKPATRICK *et al.*, 2014), como em pacientes com ELA (NIEVES *et al.*, 2016; PUPILLO *et al.*, 2018). Somado a isto, costumam coletar informações sobre a frequência de consumo, mas não necessariamente sobre a quantidade consumida.

As pontuações de diversidade alimentar avaliadas são métricas que podem ser calculadas e contam com um período de recordação mais longo para captar alimentos que não são consumidos todos os dias, mas que fazem parte da dieta típica do indivíduo.

Os períodos de recordação podem variar de 7 a 30 dias (embora alguns cheguem a um ano), sendo que os mais longos podem gerar um viés de recordação (MEJZINI *et al.*, 2019), apesar de terem a vantagem de avaliar melhor as dietas totais, mas os curtos têm taxas de resposta mais altas (KIRKPATRICK *et al.*, 2014). Essas medidas de ingestão habitual costumam ser um melhor indicador da relação entre dieta e resultados de saúde do que aquelas que capturam apenas uma única avaliação de 24 horas da dieta.

Neste sentido, o questionário de frequência alimentar mecanizada *Mechanized food-frequency questionnaire (MFFQ)* tem sido utilizado na pesquisa de dieta recente e de longo prazo, com a vantagem de poder mensurar o consumo de alimentos ou nutrientes específicos consumidos por uma determinada população, sendo um método comum para medir padrões alimentares.

## 2.8 BIOMARCADORES

Os biomarcadores tornaram-se foco de intensa pesquisa na área da ELA com a esperança de que eles possam ajudar no desenvolvimento de alguma terapia. Apesar da descoberta de muitos candidatos a biomarcadores, nenhum surgiu como ferramentas validadas para o desenvolvimento de medicamentos até o momento.

O FDA reconhece quatro tipos ou aplicações de biomarcadores: diagnóstico, prognóstico, preditivo e farmacodinâmico, reconhecendo que alguns biomarcadores podem ter mais de uma aplicação dependendo de como o biomarcador é usado (BENATAR *et al.*, 2016).

O biomarcador deve ser fácil de quantificar, minimamente invasivo, específico, confiável com um processo de medição descomplicado e reproduzível em vários laboratórios (BENATAR *et al.*, 2016). Ainda, a falta de compreensão dos mecanismos subjacentes da ELA limita o progresso do desenvolvimento de biomarcadores e desenvolvimento de medicamentos para ELA.

Os principais biomarcadores estudados até o momento são a proteína *C9orf72*, neurofilamentos, TAR *DNA-binding protein 43* (TDP-43), RNA extracelular, exossomos e grânulos de estresse, progranulina, marcadores inflamatórios como fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), interleucina-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), interleucina-98 (IL-98), TNF receptor 1 (fator de necrose tumoral receptor 1), e fator de crescimento endotelial vascular, proteína C reativa (PCR) e chitotriosidase, metabólitos como nível sérico de ferritina, glutamato e nível de serotonina em plaquetas e biomarcadores mitocondriais (WILKINS; DIMACHKIE; AGBAS, 2021).

## 2.9 METABOLISMO DA BH4

A BH4 é um composto solúvel quimicamente definido como pterina, que representa uma estrutura cíclica chamada de pteridina e que se encontra conformando diversas vitaminas hidrossolúveis, como flavinas e ácido fólico.

A BH4 atua como cofator obrigatório para a atividade das enzimas fenilalanina hidroxilase, tirosina hidroxilase e triptofano hidroxilase, as quais catalisam as etapas iniciais da degradação da fenilalanina no fígado, assim como as etapas limitantes da biossíntese dos neurotransmissores dopamina e serotonina. A BH4 é também essencial para a atividade de todas as isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS).

As NOS são responsáveis pela síntese de óxido nítrico, tendo, portanto, a BH4 também uma relevância nos sistemas endotelial, cardiovascular e em processos cognitivos (GHISONI *et al.*, 2015b; LATINI *et al.*, 2018). A BH4





A GTPCH é controlada transcricionalmente por estímulos Inflamatórios (FRANSCINI *et al.*, 2003), fator de crescimento do nervo e peróxido de hidrogênio (ISHII *et al.*, 2005), entre outros. Enquanto a atividade de GTPCH pode ser estimulada em até 100 vezes durante condições inflamatórias, a atividade de PTPS e SPR encontra-se minimamente aumentada nas mesmas condições (WERNER *et al.*, 1990). Assim, durante estados inflamatórios, a PTPS torna-se a enzima limitante na biossíntese de novo de BH4 (WERNER *et al.*, 1990), especialmente em monócitos e macrófagos humanos. Dessa forma, durante o estado inflamatório, a regulação positiva de GTPCH excede a de PTPS (a segunda etapa de síntese) gerando o acúmulo de 7,8-diidroneopterina trifosfato, que após desfosforilação, é transformada de forma não enzimática em neopterina (HAGBERG *et al.*, 2010).

## 2.11 VIA DE SALVAÇÃO

A enzima SPR presente na síntese de novo de BH4, também pode participar na via de salvação, catalisando a conversão de sepiapterina em BH2, que então é transformada em BH4 pela DHFR (WERNER; BLAU; THÖNY, 2011). Nesta via a PTP pode ser transformada em intermediários instáveis (1'-hidroxi-2'-oxotetrahydropterina (1'-Oxo-TP) ou também chamado de 6-lactoil tetrahydropterina pelas SPR que favorecem a formação direta de BH4 ou a formação não enzimática de sepiapterina, e desta em BH2 que será convertida em BH4 pela DHFR (BLAU; BONAFÉ; THÖNY, 2001; LATREMOLIERE *et al.*, 2015).

Dessa forma, a via de salvação pode sintetizar BH4 mesmo na ausência de atividade da enzima SPR.

## 2.12 VIA DE RECICLAGEM

Durante a hidroxilação enzimática dos aminoácidos aromáticos, o oxigênio molecular é transferido para o aminoácido correspondente e BH4 é oxidada a 4 $\alpha$ -hidroxi-tetrahydrobiopterina, a partir da qual BH4 é regenerada por

duas enzimas adicionais: pterina-4 $\alpha$ -carbinolamina desidratase (PCD) e DHPR (THÖNY; AUERBACH; BLAU, 2000).

A reciclagem enzimática de BH4 (Figura 1) é parte essencial do sistema de hidroxilação da fenilalanina para assegurar um fornecimento contínuo do cofator reduzido, e para evitar a acumulação de metabólitos nocivos produzidos por rearranjo de 4 $\alpha$ -hidroxitetrahidrobiopterina (BRACHER *et al.*, 1998).

A terceira via que controla as concentrações intracelulares BH4 é a via de reciclagem. Aqui, a molécula de BH4 cede um par de elétrons para a hidroxilação de fenilalanina, tirosina e triptofano sendo oxidada em BH2, a qual é reciclada em BH4 a partir da enzima DHPR, (LATREMOLIERE *et al.*, 2015), tirosina e triptofano, após hidroxilação, formam metabólitos estáveis como o ácido homovanílico e o ácido 5-hidroxi-indolacético que podem ser mensurados no LCR (LONGO, 2009).

A via de reciclagem da BH4 acontece principalmente no fígado, devido a grande demanda de BH4 para a atividade da enzima fenilalanina hidroxilase, o que conseqüentemente acaba sendo importante para manter o conteúdo fisiológico de BH4 nos demais tecidos do organismo, em especial do cérebro (WERNER; BLAU; THÖNY, 2011).

## 2.13 CONSEQUÊNCIAS NA DEFICIÊNCIA DE BH4

Devido aos efeitos intracelulares positivos da BH4, sua deficiência pode ser considerada um fator de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas como obesidade, envelhecimento, doenças vasculares, doenças neurodegenerativas, entre outras, que se caracterizam por inflamação, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (CRONIN *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2018; FUJITA *et al.*, 2020; LATREMOLIERE *et al.*, 2015)

Em concordância, níveis reduzidos de BH4 foram relatados no LCR, sangue e cérebros *postmortem* de indivíduos afetados por doenças neurodegenerativas comuns (SAWADA *et al.*, 1987), como na desordem de espectro autista (TANI *et al.*, 1994).

Outra consequência é o envolvimento da BH4 na doença de Parkinson ocorre principalmente por ser um cofator na síntese de dopamina tendo a enzima SPR como contribuinte na patogênese (TOBIN *et al.*, 2007).

## 2.14 EFEITOS DO EXCESSO DE BH4

Uma vez que a BH4 é sintetizada e a proporção BH4: BH2 adequada é alcançada, as reações enzimáticas dependentes de BH4 são estimuladas. No entanto, quando níveis excessivos de BH4 são formados, isto é, durante a inflamação ou ativação de células T, BH4 e o subproduto de seu metabolismo, neopterina, são rapidamente liberados para o meio extracelular (CRONIN *et al.*, 2018; WERNER; BLAU; THÖNY, 2011).

O aumento patológico das concentrações de BH4 na dor neuropática foi também descrito pelo nosso grupo de pesquisa, o qual demonstrou que a administração intratecal de BH4 per se é suficiente para induzir comportamento nociceptivo em animais (TEGEDER *et al.*, 2006).

Ainda, demonstrou que a síntese de BH4 aumenta em neurônios periféricos em resposta à lesão neuropática ou inflamação, decorrência da regulação positiva de enzimas de síntese (TEGEDER *et al.*, 2006).

As concentrações excessivas de BH4 são produzidas por neurônios sensoriais axotomizados e por macrófagos que infiltram nervos danificados e o tecido inflamado, contribuindo para a indução da hipersensibilidade à dor neuropática e inflamatória (LATREMOLIERE *et al.*, 2015).

A fim de estudar o potencial terapêutico da inibição da via da BH4, nosso grupo também demonstrou que ao inibir a enzima SPR, enzima também envolvida na biossíntese de BH4, as concentrações intracelulares excessivas de BH4 são diminuídas, sem induzir efeitos adversos como falhas na vasodilatação ou na neurotransmissão que poderiam decorrer da completa inibição da produção de BH4 (LATREMOLIERE *et al.*, 2015).

Ainda nosso grupo demonstrou, que a inibição da enzima SPR leva a um acúmulo do precursor metabólico da sepiapterina (LATREMOLIERE *et al.*, 2015), fato que ocorre também em pacientes portadores do erro inato do de

tratamento na prática clínica, principalmente nos indivíduos acometidos por dor crônica (FUJITA *et al.*, 2020).

Além da relação direta do aumento nas concentrações de BH4 com a geração de dor, descobertas mais recentes em nosso laboratório demonstram que a BH4 é um regulador-chave essencial para a ativação, proliferação e infiltração de células T (CRONIN *et al.*, 2018).

A inibição da sepiapterina redutase reduz a dor associada à inflamação articular, mostrando assim sua potencial utilidade como uma estratégia analgésica para dor articular inflamatória (FUJITA *et al.*, 2020).

Níveis aumentados de neopterin também foram associados independentemente com maior mortalidade em indivíduos com insuficiência hepática crônica agudizada na internação, reforçando a relevância da ativação de macrófagos no desenvolvimento e progressão da doença, e indicam que a neopterin pode ser uma opção adequada para abordar o fenômeno de ativação de macrófago na prática clínica (MATIOLLO *et al.*, 2020).

Recentemente nosso grupo de pesquisa mostrou que a inibição do gene GTP ciclohidrolase I (GCH1) em células T CD4/CD8 reduziu a ativação dessas células imunes, enquanto a hiperativação da via da BH4 promoveu a ativação dos linfócitos T CD4/CD8, evidenciando o papel essencial da BH4 para a proliferação e capacidade dessas células imunológicas de infiltrar tecidos (CRONIN *et al.*, 2018).metabolismo onde há deficiência na produção da proteína ou na atividade enzimática de SPR (BLAU; BONAFÉ; THÖNY, 2001).

A detecção de sepiapterina nos fluídos biológicos poderia ser empregada para acompanhar o grau de inibição da atividade enzimática, transformando esse metabólito em um biomarcador muito sensível da eficácia

## 2.15 EFEITOS DA BH4 E O SNC

A energia produzida a partir do metabolismo celular aeróbico gera radicais livres e o desequilíbrio entre a produção desses e sua eliminação leva ao estresse oxidativo, contribuindo para a lesão de proteínas e DNA, inflamação, tecidos danos e subsequente apoptose celular (PISOSCHI; POP, 2015).

Os neurônios têm uma demanda alta de energia, grande número de mitocôndrias e são suscetíveis a danos mediados por espécies reativas de oxigênio e são as mais vulneráveis às alterações que envolvem disfunção mitocondrial. Ao lado de fatores ambientais e genéticos, a oxidação contribui para o aparecimento de diversas patologias como como ELA, doença de Alzheimer e Doença de Parkinson (PISOSCHI; POP, 2015).

Estudos de nosso grupo demonstraram que o cofator BH4 e o derivado metabólico neopterina apresentam efeito modulador positivo sobre o processo de formação da memória hipocampal (GHISONI *et al.*, 2016; LATINI *et al.*, 2018).

Esse efeito, foi atrelado a outras propriedades descritas para esta via metabólica em sistemas pré-clínicos, com a ativação do sistema antioxidante (GHISONI *et al.*, 2015b; GHISONI, 2016; LATINI, 2015), a ativação da função mitocondrial (MARTINS *et al.*, 2018), e atividade anti-inflamatória (GHISONI *et al.*, 2016).

### **3 HIPÓTESE**

As concentrações reduzidas dos metabólitos da via metabólica da BH4 podem ser identificadas em fluídos biológicos de indivíduos acometidos por ELA. Devido a importância da resposta inflamatória patológica na ELA, em que mediadores inflamatórios promovem um estado de estresse oxidativo e que a BH4 apresenta atividade antioxidante e sustenta a atividade mitocondrial, hipotetiza-se que baixas concentrações de BH4 possam ser identificadas precocemente em pacientes acometidos pela doença, antes dos sintomas estarem instalados, e possam ser um marcador na predição da progressão da mesma.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o metabolismo da BH4 em fluídos biológicos de indivíduos acometidos por ELA com o intuito de identificar um biomarcador sensível e específico que possa determinar a presença da doença.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Definir clinicamente indivíduos afetados por ELA mediante a mensuração de:

a.1. Dados demográficos e socioeconômicos incluindo sexo, idade, cidade de domicílio, estado civil, cor de pele referida pelo participante, escolaridade, abuso de álcool e tabagismo;

a.2. Dados clínicos, como data e idade de início dos sintomas, tempo do início dos primeiros sintomas até o momento do diagnóstico, duração da doença, sintomas de ventilação como de dispneia de esforço, despertares noturnos, sonhos vívidos, cefaleia matinal, sonolência diurna e fadiga presença de câimbras, primeiros sintomas relatados, classificação em fenótipos clínicos de ELA de início bulbar e ELA de início espinhal, categorização em ELA de início cervical, ELA de início lombar, ELA de início bulbar, esclerose lateral primária, atrofia muscular progressiva, síndrome de *flail leg*, síndrome de *flail arm*, ELA com demência frontotemporal e síndrome ELA *plus* com sinais extrapiramidais, história de consanguinidade dos pais, histórico familiar de ELA, utilização de riluzol, exames complementares como ressonância magnética de encéfalo e de coluna cervical, eletroneuromiografia (ENMG), espirometria e polissonografia, utilização de gastrostomia e de ventilação não-invasiva *Bilevel Positive Pressure Airway (BiPAP)*, ventilação mecânica e traqueostomia;

a.3. Aplicação de escalas e instrumentos de medida: Índice de massa corporal (IMC), critérios de *Awaji-Shima*, escala de estado de saúde da ELA (ALSHSS), escala de avaliação funcional revisada da ELA para a língua portuguesa *amyotrophic lateral sclerosis functional rating scale - revised* – (ALSFRS-R/BR), questionário de avaliação de qualidade de vida da ELA



*amyotrophic lateral sclerosis assessment questionnaire* (ALSAQ-40/BR), escala de sonolência diurna de *Epworth* e MFFQ;

a.4. Mensuração de exames bioquímicos e as principais mutações gênicas em ELA.

b) Determinar as concentrações do metabólito da via de síntese de BH<sub>4</sub>, a neopterina, no plasma de indivíduos acometidos por ELA.

c) Correlacionar as concentrações de neopterina com os dados clínicos dos indivíduos afetados por ELA.

d) Determinar a sensibilidade e especificidade da neopterina plasmática como classificador de indivíduos acometidos por ELA.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 DESENHO DO ESTUDO

Este estudo foi do tipo transversal, em indivíduos com o diagnóstico de ELA, selecionados ao longo de 22 meses (03/2020-01/2022).

### 5.2 POPULAÇÃO

O estudo esteve constituído por indivíduos residentes no Brasil com idade mínima de 18 anos e que atendiam aos critérios de elegibilidade.

### 5.3 SELEÇÃO DE PARTICIPANTES

#### 5.3.1 Participantes afetados por ELA

Os participantes de este estudo foram conformados por indivíduos afetados por ELA que realizavam acompanhamento regular no ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HUPEST), na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis – Santa Catarina. Todos os participantes foram diagnosticados clinicamente com ELA segundo os critérios de *Awaji-Shima* (DE CARVALHO et al., 2008) [revisados a partir dos critérios de *El Escorial*, 1994 (BROOKS, 1994) e atualizados em 2000 (BROOKS et al., 2000) (BROOKS et al., 2000)]. Os participantes preencheram os critérios para ELA clinicamente definida, clinicamente provável ou clinicamente possível (ver Tabela 6).

Devido a este projeto de mestrado ter sido executado durante o curso da pandemia global do COVID-19 (do Inglês, *Coronavirus Disease 2019*), doença infecciosa causada pelo SARS-CoV-2 (do Inglês, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) (WHO, 2021), ocorreram alguns empecilhos, como o fechamento dos todos os laboratórios do centro de ciências biológicas da UFSC, incluindo o de bioenergética e estresse oxidativo (LABOX), bem como o laboratório de análises clínicas do HUPEST, prejudicando a coleta e análise de materiais para pesquisas científicas desde março de 2020 até julho de 2021.

As reaberturas destas unidades aconteceram no segundo semestre do ano de 2021, com restrições quanto ao número de pessoas circulantes naqueles ambientes. As realizações das coletas dos materiais biológicos dos participantes puderam ser iniciadas em agosto de 2021. Desta forma, só foi possível realizar uma única avaliação por participante.

Outro fato relevante em decorrência da pandemia global do COVID-19 no desenvolvimento deste estudo, foi a constatação de óbito de cerca de 50 % dos participantes em acompanhamento ambulatorial no serviço acima mencionado, resultando em doze indivíduos que permaneceram em seguimento. Esses indivíduos, após explicação sobre os objetivos desta pesquisa, aceitaram em participar deste estudo. Contudo, foi necessário intensificar a publicização do presente estudo a outros setores, tendo sido divulgado dentro da comunidade acadêmica e médica, como em grupos de médicos via aplicativo de WhatsApp, por correio eletrônico institucional a entidades filantrópicas e associações de pacientes relacionadas a ELA, a todos os farmacêuticos das farmácias-escola estaduais vinculados a Secretaria Estadual de Saúde Santa Catarina, bem como pelo website da UFSC através do link de acesso <https://pode.ufsc.br/interno/ofertas/anuncio/avaliacao-clinica-bioquimica-e-epidemiologica-de-pacientes-com-esclerose-lateral-amiotrofica-atendidos-no-hospital-universitario>.

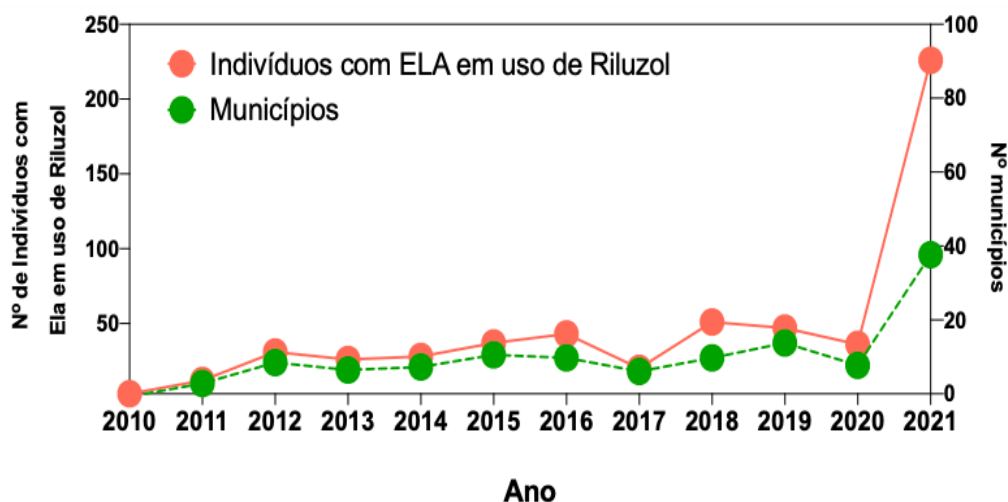
Simultaneamente, foi solicitado formalmente à diretoria de assistência farmacêutica (DIAF) uma lista dos pacientes acometidos por ELA que utilizavam medicamento riluzol. A DIAF está vinculada à Secretaria do Estado da Saúde de Santa Catarina, e tem a função de avaliar processos de solicitação, bem como a dispensação do medicamento riluzol, fármaco destinado ao tratamento de indivíduos portadores da ELA.

Partindo do pressuposto de não existir dados sobre a estatística de incidência e prevalência da ELA no estado de Santa Catarina, e a DIAF concentrar a liberação desta medicação a todos os pacientes residentes no estado, a relação dos indivíduos que estavam em uso de riluzol seria a estimativa mais aproximada que poderia ser obtida com este objetivo. A base de dados da DIAF está composta por dados de identificação pessoal, incluindo o nome completo do paciente, data de nascimento, cidade de domicílio, telefone e/ou endereço eletrônico, situação do processo e data da última dispensação de

riluzol. Por intermédio desta base de dados, obteve-se um total de 560 indivíduos cadastrados entre o período de 01/06/2010 a 25/10/2021, conforme discriminado no fluxograma da Figura 3. Estes sujeitos estavam distribuídos entre 140 municípios do Estado de Santa Catarina, representando 47,5 % do total dos municípios catarinenses.

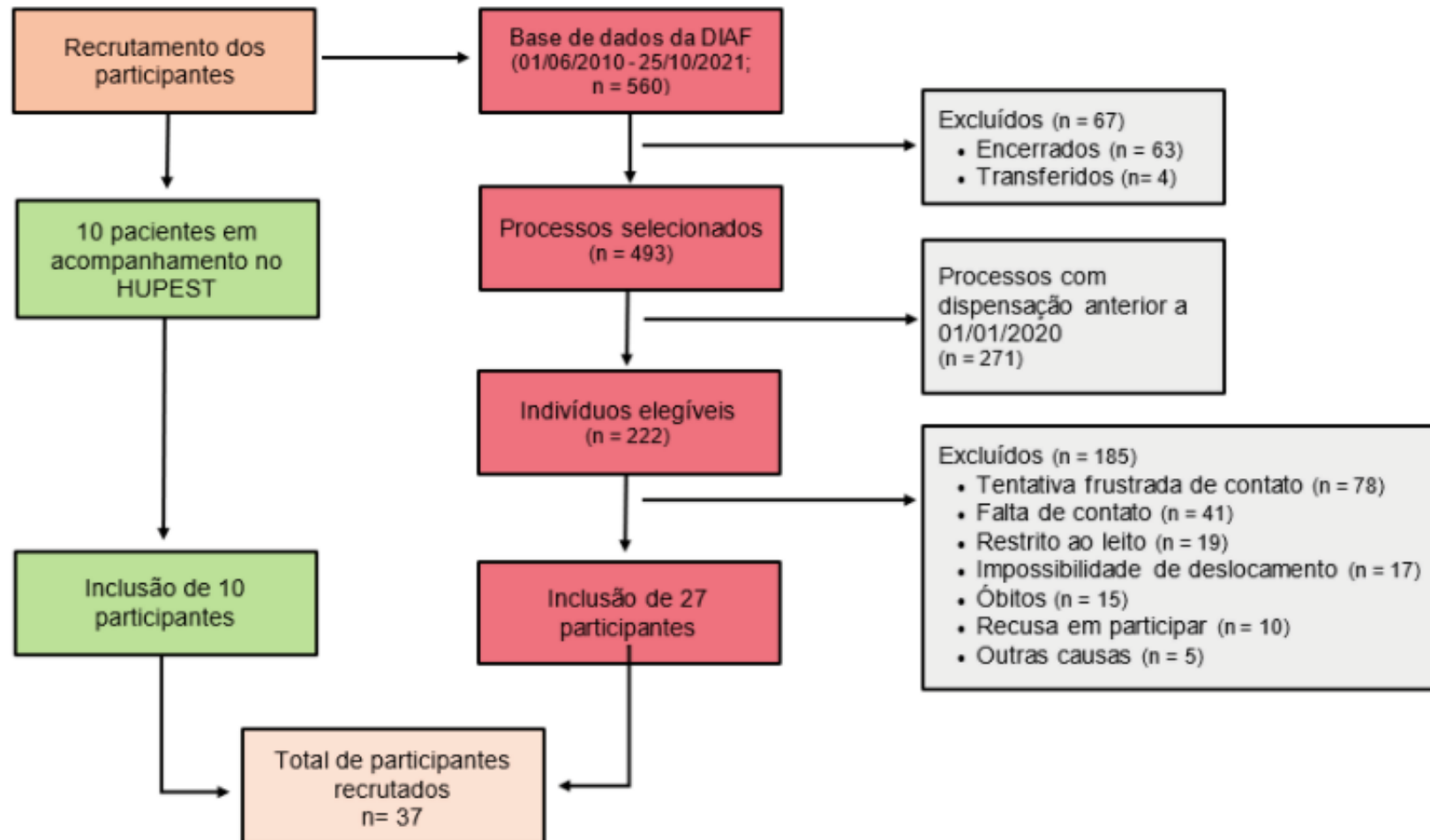
A Figura 2 representa a distribuição do número de indivíduos por município de domicílio no estado de Santa Catarina em uso de riluzol entre os anos de 2010 a 2021, na Figura 4 mostra o mapa de acordo com a distribuição geográfica e na Tabela 1 a distribuição da quantidade de indivíduos com ELA em uso de riluzol por município neste período.

Figura 2 - Número e distribuição dos indivíduos por município do estado de Santa Catarina em uso de riluzol entre os anos de 2010 a 2021.



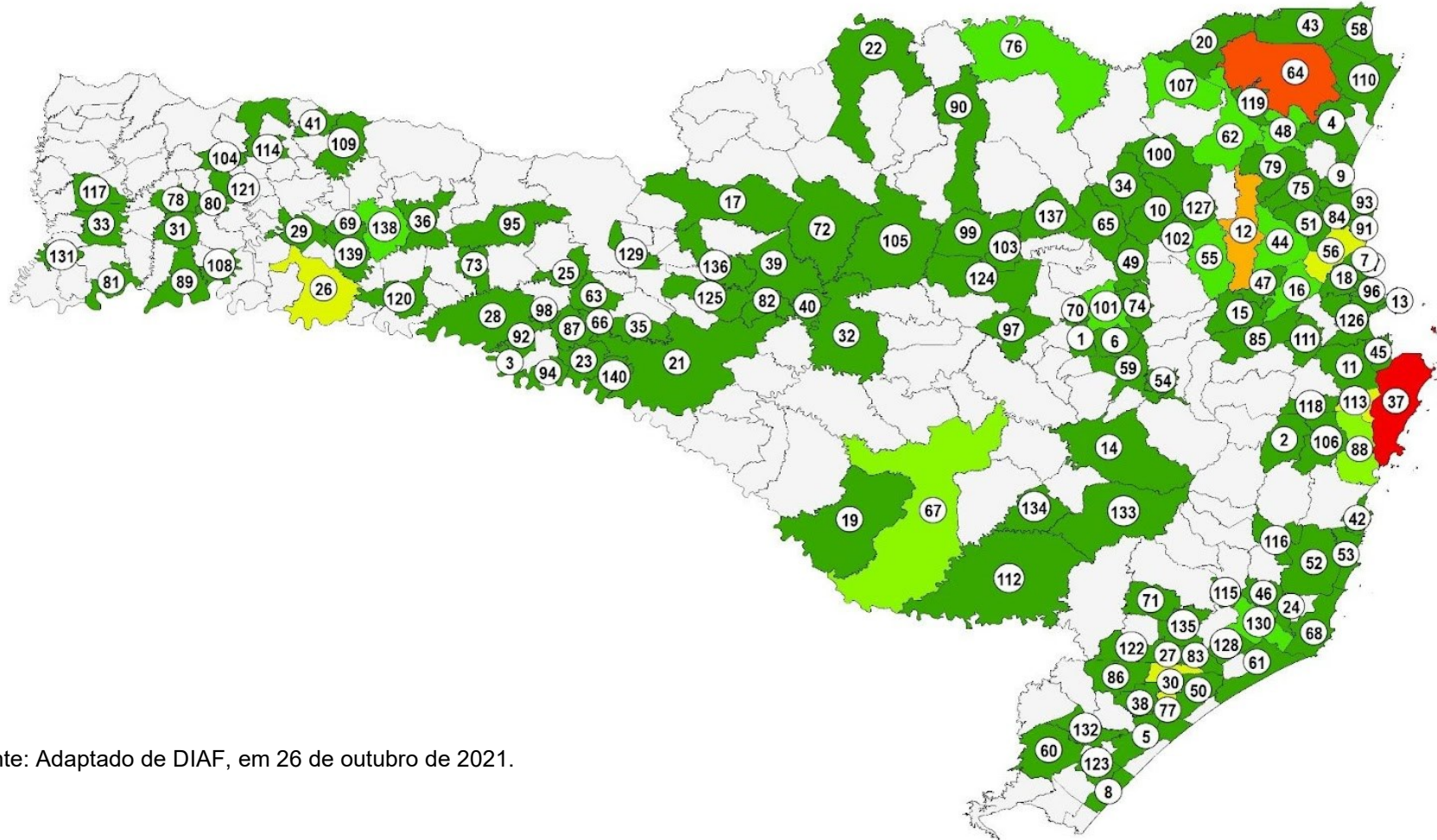
Fonte: Adaptado de DIAF, em 26 de outubro de 2021.

Figura 3 - Fluxograma do processo de recrutamento de participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica no estado de Santa Catarina.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Figura 4 - Indivíduos diagnosticados com esclerose lateral amiotrófica (ELA) em uso de riluzol de acordo com a base de dados da DIAF (diretoria de assistência farmacêutica). No mapa se apresenta o número de indivíduos em uso de riluzol entre os anos de 2010 a 2021, e a distribuição geográfica por município do estado de Santa Catarina.



Fonte: Adaptado de DIAF, em 26 de outubro de 2021.

Tabela 1- Distribuição dos sujeitos de estudo de acordo com o município de residência no estado de Santa Catarina.

Nº Município	Município	Nº Indivíduos	Nº Município	Município	Nº Indivíduos
1	Agronômica	1	48	Guaramirim	6
2	Águas Mornas	1	49	Ibirama	2
3	Alto Bela Vista	1	50	Içara	2
4	Araquari	1	51	Ilhota	3
5	Araranguá	5	52	Imaruí	2
6	Aurora	1	53	Imbituba	5
7	Balneário Camboriú	20	54	Imbuia	1
8	Balneário Gaivota	2	55	Indaial	10
9	Barra Velha	3	56	Itajaí	25
10	Benedito Novo	1	57	Itapema	2
11	Biguaçu	4	58	Itapoá	2
12	Blumenau	31	59	Ituporanga	1
13	Bom Retiro	1	60	Jacinto Machado	1
14	Bombinhas	1	61	Jaguaruna	1
15	Botuverá	2	62	Jaraguá do Sul	8
16	Brusque	9	63	Joaçaba	2
17	Caçador	5	64	Joinville	45
18	Camboriú	4	65	José Boiteux	1
19	Campo Alegre	1	66	Lacerdópolis	1
20	Campos Novos	1	67	Lages	14
21	Canoinhas	2	68	Laguna	2
22	Capão Alto	1	69	Lajeado Grande	2
23	Capinzal	3	70	Laurentino	1
24	Capivari de Baixo	2	71	Lauro Muller	1
25	Catanduas	1	72	Lebon Régis	1
26	Chapecó	21	73	Lindóia do Sul	2
27	Cocal do Sul	1	74	Lontras	2
28	Concórdia	5	75	Luiz Alves	1
29	Coronel Freitas	2	76	Mafra	7
30	Criciúma	25	77	Maracajá	1
31	Cunha Porã	3	78	Maravilha	1
32	Curitibanos	5	79	Massaranduba	4
33	Descanso	2	80	Modelo	1
34	Doutor Pedrinho	1	81	Mondaí	2
35	Erval Velho	1	82	Monte Carlo	1
36	Faxinal dos Guedes	1	83	Morro da Fumaça	3
37	Florianópolis	47	84	Navegantes	5
38	Forquilha	1	85	Nova Trento	2
39	Fraiburgo	1	86	Nova Veneza	3
40	Frei Rogério	1	87	Ouro	1
41	Galvão	1	88	Palhoça	12
42	Garopaba	1	89	Palmitos	1
43	Garuva	1	90	Papanduva	2
44	Gaspar	8	91	Penha	1
45	Governador Celso Ramos	3	92	Peritiba	1
46	Gravatal	2	93	Piçarras	4
47	Guabiruba	3	94	Piratuba	2
95	Ponte Serrada	3	119	Schroeder	2
96	Porto Belo	1	120	Seara	3
97	Pouso Redondo	2	121	Serra Alta	1
98	Presidente Castello Branco	1	122	Siderópolis	1
99	Rio do Campo	1	123	Sombrio	2
100	Rio do Sul	6	124	Taió	2
101	Rio dos Cedros	3	125	Tangará	2
102	Rodeio	1	126	Tijucas	5
103	Salete	1	127	Timbó	2
104	Saltinho	2	128	Treze de Maio	1

105	Santa Cecília	1	129	Treze Tílias	2
106	Santo Amaro da Imperatriz	3	130	Tubarão	9
107	São Bento do Sul	6	131	Tunápolis	1
108	São Carlos	1	132	Turvo	1
109	São Domingos	1	133	Urubici	2
110	São Francisco do Sul	1	134	Urupema	1
111	São João Batista	3	135	Urussanga	2
112	São Joaquim	1	136	Videira	3
113	São José	21	137	Vitor Meireles	1
114	São Lourenço Oeste	2	138	Xanxerê	6
115	São Ludgero	2	139	Xaxim	4
116	São Martinho	1	140	Zortéa	1
117	São Miguel d Oeste	1			
118	São Pedro Alcântara	1			
<b>Total</b>					<b>560</b>

Fonte: Adaptado de DIAF, em 26 de outubro de 2021.

Contudo, esta lista inicial não seria a verdadeira base populacional que potencialmente poderia ser objeto de pesquisa. Deste modo, foi necessário aplicar alguns critérios que levaram em consideração diversos aspectos como a fisiopatologia da doença, o tempo médio de vida do enfermo e os aspectos sócios-econômicos que poderiam resultar ou não na efetiva participação no estudo. A partir dos processos selecionados, constatou-se que o prazo de mais de uma década de dispensação da medicação poderia não refletir a possibilidade do sujeito estar vivo, pois, em virtude da evolução da doença e a perda progressiva de sua capacidade funcional e autocuidado, menor seria a probabilidade de poderem participar da pesquisa.

Ainda, considerando o tempo médio de sobrevida de três a cinco anos após o diagnóstico, a taxa de sobrevivência de 25 % em pacientes com mais de cinco anos de diagnóstico, o fato de não haver rigor na atualização cadastral estadual e a eventualidade de óbito neste íterim que não foi informado pela família ao DIAF, tal cadastro poderia não representar fidedignamente a realidade.

Devido a essa limitação, definiu-se um segundo critério baseado na seleção de indivíduos que tivessem realizado a dispensação do riluzol a partir de 01/01/2020. Essa definição resultou na exclusão de 271 cadastros adicionais que apresentavam a data da última dispensação anterior a 01/01/2020, perfazendo, ao final, 222 indivíduos elegíveis.

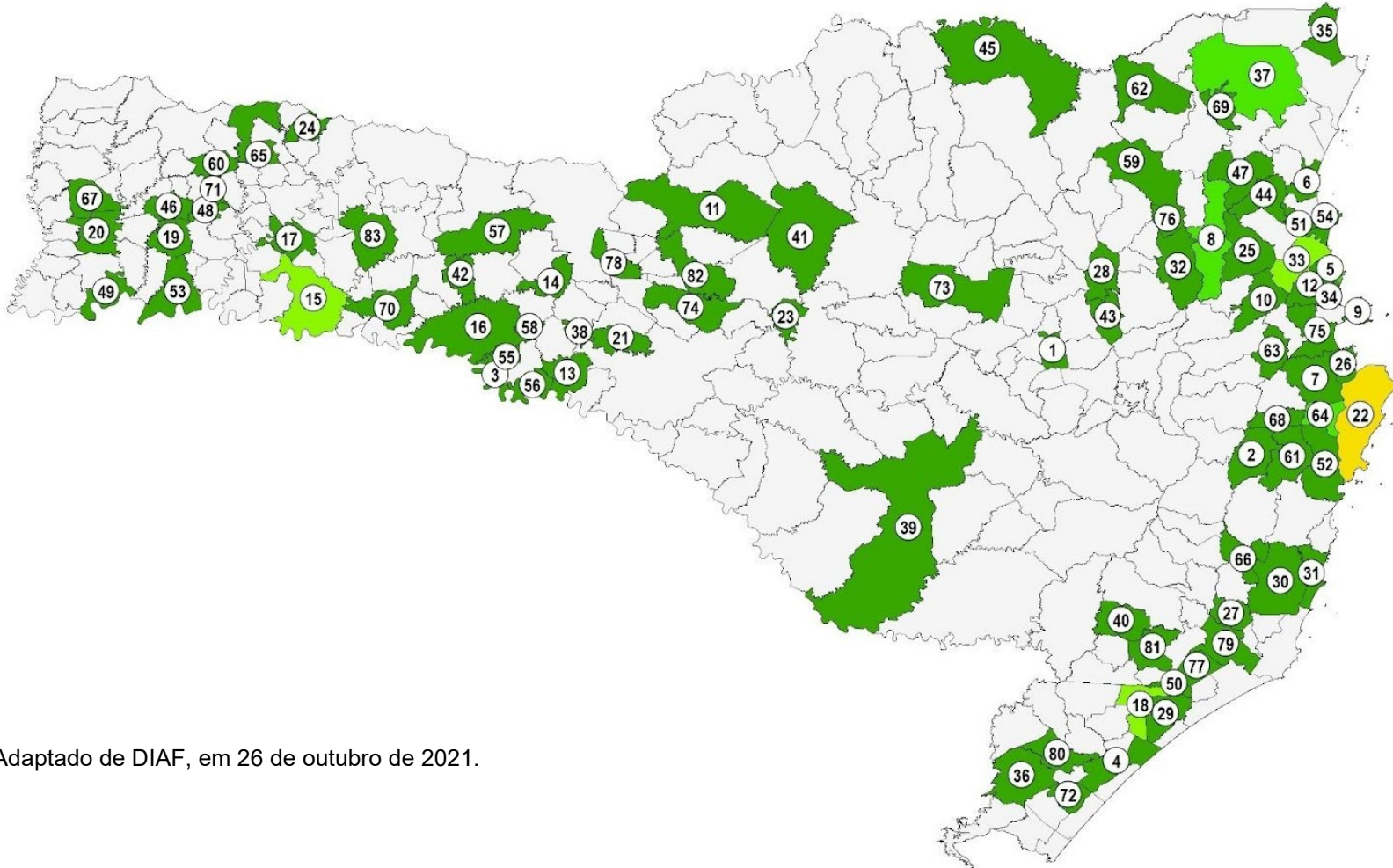
A Figura 5 representa o mapa de acordo com a distribuição geográfica do número de indivíduos por municípios de domicílio destes 222 indivíduos e na



Tabela 2 a distribuição da quantidade de indivíduos com ELA em uso de riluzol por município neste período. Estes sujeitos estavam distribuídos em 83 municípios catarinenses, representando 28,1 % de todos os municípios do estado.

Os dados obtidos foram separados por mesorregiões do estado de Santa Catarina, com o anseio de otimizar os trabalhos de contatar os indivíduos a participarem de forma voluntária no presente estudo.

Figura 5 - Indivíduos diagnosticados com esclerose lateral amiotrófica (ELA) em uso de riluzol de acordo com a base de dados de à diretoria de assistência farmacêutica (DIAF). No mapa se apresenta o número de indivíduos em uso de riluzol no período 01/01/2020 a 25/10/2021, e a distribuição geográfica por município do estado de Santa Catarina.



Fonte: Adaptado de DIAF, em 26 de outubro de 2021.

Tabela 2 - Distribuição dos 222 indivíduos com ELA em uso de riluzol por município de domicílio no estado de Santa Catarina no período de 01/01/2020 a 25/10/2021.

Nº	Município	Nº	Nº	Município	Nº
Município		Indivíduos	Município		Indivíduos
1	Agronômica	1	44	Luiz Alves	1
2	Águas Mornas	1	45	Mafra	2
3	Alto Bela Vista	1	46	Maravilha	1
4	Araranguá	1	47	Massaranduba	1
5	Balneário Camboriú	7	48	Modelo	1
6	Barra Velha	1	49	Mondaí	2
7	Biguaçu	1	50	Morro da Fumaça	1
8	Blumenau	10	51	Navegantes	3
9	Bombinhas	1	52	Palhoça	5
10	Brusque	4	53	Palmitos	1
11	Caçador	4	54	Penha	1
12	Camboriú	2	55	Peritiba	1
13	Capinzal	2	56	Piratuba	1
14	Catanduvas	1	57	Ponte Serrada	2
15	Chapecó	13	58	Presidente Castello Branco	1
16	Concórdia	3	59	Rio dos Cedros	2
17	Coronel Freitas	2	60	Saltinho	2
18	Criciúma	13	61	Santo Amaro da Impe	1
19	Cunha Porã	3	62	São Bento do Sul	1
20	Descanso	1	63	São João Batista	1
21	Erval Velho	1	64	São José	9
22	Florianópolis	27	65	São Lourenço d Oeste	2
23	Frei Rogério	1	66	São Martinho	1
24	Galvão	1	67	São Miguel d Oeste	1
25	Gaspar	3	68	São Pedro de Alcântara	1
26	Governador Celso Ramos	3	69	Schroeder	1
27	Gravatal	1	70	Seara	1
28	Ibirama	1	71	Serra Alta	1
29	Içara	1	72	Sombrio	1
30	Imaruí	2	73	Taió	2
31	Imbituba	5	74	Tangará	2
32	Indaial	5	75	Tijucas	1
33	Itajaí	13	76	Timbó	2
34	Itapema	1	77	Treze de Maio	1
35	Itapoá	1	78	Treze Tilias	1
36	Jacinto Machado	1	79	Tubarão	2
37	Joinville	9	80	Turvo	1
38	Lacerdópolis	1	81	Urussanga	1
39	Lages	1	82	Videira	1
40	Lauro Muller	1	83	Xanxerê	6
41	Lebon Régis	1			
42	Lindóia do Sul	1			
43	Lontras	1			
				<b>Total</b>	<b>222</b>

Fonte: Adaptado de DIAF, em 26 de outubro de 2021.

Nessa linha de trabalho, constatou-se que dos 222 indivíduos elegíveis contatados um montante de 185 foram excluídos da lista devido aos seguintes motivos: tentativa frustrada de contato (n = 78); ausência de contato telefônico e/ou e-mail no cadastro (n = 41); indivíduos restritos ao leito (n = 19); impossibilidade de deslocamento (n = 17); óbitos (n = 15); recusa em participar

(n = 10); sem condições financeiras de deslocamento (n = 2) e impossibilidade devido à outras doenças (n = 3) (ver fluxograma; Figura 1).

Ao final de todas as exclusões relatadas, obteve-se um total de 27 indivíduos que qualificaram para inclusão no presente estudo. Desta forma, 37 participantes foram incluídos no presente estudo. 10 provenientes do HUPEST e 27 advindos da busca ativa relatada no texto acima do HUPEST e 27 advindos da busca ativa relatada acima. Os 37 participantes residiam em 17 municípios distintos, representando 5,8 % do total das cidades do estado.

Os 37 participantes residiam em 17 municípios distintos, representando 5,8 % do total das cidades do estado.

Dentro desta amostra, e tendo em vista o levantamento da subpopulação de indivíduos acamados mencionados anteriormente, um total de 8 advieram da região da grande Florianópolis e por conseguinte, obteve-se êxito no contato com 5 sujeitos, que não tinham condições de deslocamento até o HUPEST.

Assim, diante dessa dificuldade, tivemos que implementar outra forma de avaliar os indivíduos, e desta forma 3 dos 5 participantes aceitaram o convite e consentiram na realização de uma entrevista e coleta de exames domiciliar, realizada pela equipe do LABOX.

### **5.3.2 Voluntários saudáveis**

O grupo controle, pareado por sexo e idade, foi constituído por voluntários saudáveis provenientes da cidade de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Os participantes apresentaram índice de massa corporal (IMC) menor que 25, não relataram queixa de dor crônica, não apresentaram história prévia de doenças neuropsiquiátricas, de condições crônicas inflamatórias ou autoimunes, não apresentaram história de internação, de cirurgia, de doenças infectocontagiosas, ou de uso de anti-inflamatórios e antibióticos por mais de três dias nos últimos três meses; sem gestação ou puerpério nos últimos seis meses, e sem história de neoplasia nos últimos doze meses.

Todos os voluntários saudáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Cada voluntário coletou amostras de sangue e urina no laboratório de análises clínicas no HUPEST.

## 5.4 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

### 5.4.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos indivíduos com diagnóstico de ELA, definidos pelos critérios de *Awaji-Shima* em ELA clinicamente definida, clinicamente provável ou clinicamente possível. Participantes com variantes de atrofia muscular progressiva, esclerose lateral primária, síndrome de *Flail Leg* e *Flail Arm*, ELA com DFT e síndrome ELA *plus* com sinais extrapiramidais também foram incluídos. Os indivíduos tinham idade maior ou igual 18 anos, aceitaram participar do estudo e assinaram o TCLE por conta própria (ou por seu representante legal) (Apêndice A), aprovado pelo comitê de ética em pesquisa em seres humanos (CAAE: 74845217.6.0000.0121) (Apêndice B).

### 5.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos indivíduos que não preencheram os critérios de inclusão, os menores de 18 anos (para evitar a classificação incorreta com doenças de neurônios motores de início juvenil), recusa em participar, e indivíduos com quaisquer outras condições médicas, psiquiátricas ou sociais que sabidamente pudessem mimetizar o diagnóstico.

## 5.5 AVALIAÇÃO CLÍNICA E COLETA DE DADOS

### 5.5.1 Aplicação de questionário

Durante a entrevista, os participantes foram questionados sobre os dados demográficos e socioeconômicos incluindo sexo, idade, cidade de domicílio, estado civil, cor de pele referida pelo participante, escolaridade, abuso de álcool e tabagismo.

Todos os questionamentos foram baseados em questionário apropriado e já estabelecido (Apêndice C). Em relação aos dados clínicos, os participantes foram indagados sobre a data e idade de início dos sintomas, bem como a data do diagnóstico.

O tempo do início dos primeiros sintomas até o momento do diagnóstico foi calculado como o total de meses a partir do primeiro mês e ano em que o participante identificou o primeiro sintoma até o mês do diagnóstico, noticiado pelo neurologista assistente. Enquanto que a duração da doença foi computada como o total de meses a partir do primeiro mês e ano em que o participante identificou a primeira queixa até o dia da entrevista deste estudo.

Na abordagem dos sintomas de ventilação, os participantes foram questionados sobre a presença de dispnéia de esforço, despertares noturnos, sonhos vívidos, cefaléia matinal, sonolência diurna e fadiga. Os participantes foram ainda indagados sobre a presença, local de acometimento e duração (em meses) de câimbras, e quais foram os primeiros sintomas relatados.

Os participantes foram classificados em ELA de início bulbar e ELA de início espinhal de acordo com o local da apresentação inicial dos sintomas. Em relação às características clínicas, os participantes foram categorizados em ELA de início cervical, ELA de início lombar, ELA de início bulbar, esclerose lateral primária, atrofia muscular progressiva, síndrome de *flail leg*, síndrome de *flail arm*, ELA com demência frontotemporal (DFT) e síndrome ELA *plus* com sinais extrapiramidais, ao diagnóstico e na atualidade.

Os participantes foram também questionados sobre consanguinidade dos pais com a finalidade de se obter o histórico familiar de ELA, a utilização de riluzol, e a disponibilidade de estudos prévios e complementares como, por exemplo, de ressonância magnética de encéfalo e de coluna cervical, ENMG, espirometria e polissonografia.

Finalmente, os participantes foram questionados sobre a utilização de gastrostomia e de ventilação não-invasiva (*BiPAP*), ventilação mecânica e traqueostomia.

## 5.5.2 Aplicação de escalas

As seguintes escalas, questionários e medidas foram aplicados para a caracterização clínica dos participantes acometidos por ELA: o IMC, os critérios de Awaji-Shima (Anexo A), escala de estado de saúde da ELA (ALSHSS) (Anexo B), escala de avaliação funcional revisada da ELA para a língua portuguesa (*amyotrophic lateral sclerosis functional rating scale -revised* – (ALSFRS-R/BR) (Anexo C), questionário de avaliação de qualidade de vida da ELA *amyotrophic lateral sclerosis assessment questionnaire* (ALSAQ-40/BR) (Anexo D), escala de sonolência diurna de *Epworth* (Anexo E) e questionário de frequência alimentar mecanizada (*mechanized food-frequency questionnaire* – MFFQ) (Anexo F).

### 5.5.2.1 IMC

O IMC é uma medida internacional usada para calcular se uma pessoa está no peso ideal. O peso e a estatura são mensurados para obter o IMC, o qual é calculado por meio da equação peso em quilogramas dividido pela altura em metros ao quadrado) (WHO, 1986), e classificados em baixo, normal sobrepeso, e obeso (Tabela 3). A determinação do IMC é necessária para controlar e quantificar a perda de peso ao longo do curso da doença.

Tabela 3 - Classificação do índice de massa corporal (IMC) segundo a Organização Mundial de Saúde

IMC	Classificação
< 18,5	Abaixo do peso normal
18,5 – 24,9	Peso normal
25 – 29,9	Sobrepeso
30,0 – 34,9	Obesidade classe I
35,0 – 39,9	Obesidade classe II (severa)
≥ 40,0	Obesidade classe III (mórbida)

Fonte: WHO, 1986.

### 5.5.2.2 Critérios de Awaji-Shima

Os critérios de *Awaji-Shima* foram utilizados para classificar os participantes em diferentes categorias diagnósticas. As categorias clínicas de ELA clinicamente definitiva, clinicamente provável, clinicamente provável com

suporte laboratorial e possível, foram baseadas nos critérios de *El Escorial*, primeiramente redigido em 1994 (BROOKS, 1994) e revisado pelos critérios de *Airlie House*, ou *El Escorial* modificado (BROOKS et al., 2000). Em 2006, numa conferência em Awaji no Japão, debateram-se os critérios diagnósticos da ELA e a importância dos achados eletrofisiológicos.

O algoritmo de Awaji acrescentou aos critérios a presença de potenciais de fasciculações achados na eletromiografia como sendo representativos de desnervação aguda, complementando os achados clínicos de desnervação crônica. Desta forma, redefiniram-se as categorias diagnósticas em:

**ELA clinicamente definitiva:** Evidência clínica ou eletrofisiológica de atingimento do NMS e NMI na região bulbar e em pelo menos duas regiões medulares; ou a presença de sinais de atingimento do NMS e do NMI em três regiões medulares;

**ELA clinicamente provável:** Evidência clínica ou eletrofisiológica de atingimento do NMS e NMI em pelo menos duas regiões com alguns sinais de atingimento do NMS necessariamente mais superiores aos do NMI; e

**ELA clinicamente possível:** Evidência clínica ou eletrofisiológica de atingimento do NMS e NMI em apenas uma região; ou sinais de atingimento do NMS isolado em duas ou mais regiões; ou sinais de atingimento do NMI mais superiores aos do NMS (CARVALHO *et al.*, 2008).

### 5.5.2.3 Escala ALSHSS

A escala *ALSHSS* categoriza os pacientes em quatro subgrupos de gravidade.

**Estado I (leve):** O déficit é visto em apenas uma das três regiões (fala, braço ou perna) e o paciente é funcionalmente independente na fala, atividades de extremidade superior da vida diária e deambulação.

**Estado II (moderado):** O déficit é visto em todas as três regiões ou déficit moderado a severo em uma região enquanto as outras duas regiões são normais ou ligeiramente afetadas.

**Estado III (grave):** O paciente necessita de assistência em duas ou três regiões: a fala é disártrica e/ou o paciente necessita de assistência para caminhar e / ou com atividades de extremidade superior da vida diária.

**Estado IV (terminal):** Uso não-funcional de pelo menos duas regiões e uso moderado ou não funcional da terceira região (RIVIERE *et al.*, 1998).



#### 5.5.2.4 Escala ALSFRS-R/BR

A ALSFRS-R/BR é um sistema de pontuação para avaliar a incapacidade funcional. A escala compreende doze subescalas que são categorizadas em quatro domínios, incluindo bulbar, motricidade fina, motricidade bruta/tronco e função respiratória. Cada subescala é pontuada de 0 (incapaz de fazer) a 4 (função normal), e a pontuação total é entre 0 e 48, sendo que números mais altos indicam menor incapacidade (GUEDES *et al.*, 2010).

#### 5.5.2.5 Questionário ALSAQ-40/BR

Como instrumento de avaliação da qualidade de vida foi utilizado o ALSAQ-40/BR. Trata-se de um questionário de qualidade de vida específico para a população afetada por ELA, com adaptação transcultural para a população brasileira (PAVAN *et al.*, 2010). O questionário é autoaplicável, validado e específico para indivíduos com ELA, sendo composto por 40 questões subdivididas em cinco domínios, com itens específicos para cada um. O objetivo deste questionário é mostrar a extensão do estado da doença em cada um dos cinco domínios. 1 - Mobilidade (10 itens), 2 – Atividades de vida diária (10 itens), 3 – Alimentação e deglutição (3 itens), 4 - Comunicação (7 itens) e 5 - Aspectos emocionais (10 itens). Para cada item há cinco possibilidades de resposta: “nunca”, “raramente”, “às vezes”, “frequentemente” e “sempre”.

A pontuação da escala varia entre 0 e 100 dentro de cada domínio, sendo realizado um cálculo matemático em cada domínio. Uma pontuação de 0 a 19 em um domínio significa que o paciente não apresenta dificuldade; 20 a 39, raramente apresenta dificuldade; 40 a 59, às vezes apresenta dificuldade; 60 a 79, frequentemente apresenta dificuldade; e 80 a 100 sempre apresenta dificuldade. Dessa forma, o questionário informa que quanto mais próximo de zero, melhor a qualidade de vida e quanto mais próximo de cem, mais comprometida a qualidade de vida.

#### 5.5.2.6 Escala de sonolência diurna de Epworth

A Escala de sonolência de Epworth trata-se de um questionário autoaplicável que avalia a probabilidade de adormecer em oito situações

envolvendo atividades diárias, algumas delas conhecidas como sendo altamente soporíficas. O escore global varia de 0 a 24, sendo que os escores acima de 10 sugerem o diagnóstico da sonolência diurna excessiva (BERTOLAZI *et al.*, 2009).

#### 5.5.2.7 Questionário de frequência alimentar mecanizada (*Mechanized food-frequency questionnaire – MFFQ*)

Este questionário foi adaptado do artigo de revisão de questionários desenvolvidos e validados para a população brasileira (PEDRAZA; MENEZES, 2015). Tais modificações estão de acordo também com futuros estudos envolvendo a determinação do metatranscriptoma de microrganismos na saliva dos participantes. Este foi constituído por perguntas abertas e fechadas, divididos em três tópicos. No primeiro, foi indagado se o participante seguiu alguma dieta específica no último mês (antes da entrevista) e/ou nos últimos 5 anos, com listagem de 14 diferentes tipos de dieta (para mais detalhes ver anexo F), com espaço para assinalar as que tinha realizado. Em seguida, a questão abordada foi se realizou dieta de eliminação no último mês e/ou nos últimos cinco anos, e abaixo, um campo de texto livre para preenchimento.

O segundo tópico teve um espaço para que os entrevistados relatassem alimentos que evitou. Por último, no terceiro tópico foi perguntada a frequência que consumiu alguns tipos de alimentos, agrupados segundo suas características nutricionais, que resultou em uma lista com onze itens alimentares, incluindo carne vermelha, aves, peixes, laticínios, porção de vegetais, frutas, *fast food*, sobremesas ou lanches doces, bebidas doces, alimentos fritos e bebidas alcoólicas. Quanto à frequência, os participantes informavam se nunca consumiam, se consumiam 1 a 3 vezes/semana ou mais que 3 vezes/semana, nas duas últimas semanas anteriores a entrevista.

## 5.6 DETERMINAÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS NOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

### 5.6.1 Determinação dos exames genéticos

O painel de exames genéticos foi realizado com o apoio do programa de testes genéticos gratuitos denominado *detect*, fornecido pela empresa invitae®, através do teste patrocinado para doenças neurodegenerativas do adulto ([www.invitae.com](http://www.invitae.com)). Este painel foi denominado de ELA, demência frontotemporal, doenças de Alzheimer e de Parkinson e parkinsonismo hereditários.

Na Tabela 4 está apresentada a lista completa de genes analisados por indivíduo, incluindo o(s) transcrito(s) de gene relevante(s) quando mais de uma transcrição foi listada para um único gene, as variantes foram relatadas usando o primeiro transcrito listado. Variantes benignas e provavelmente benignas não foram incluídas no relatório final apresentado pela empresa.

Para poder receber estes testes de forma gratuita, foi necessário compartilhar algumas informações dos participantes. O cadastro do participante foi assim feito junto ao site oficial da empresa. A seguir, para realizar a solicitação do kit comercial que permite a coleta de amostra biológica, enviou-se um e-mail para a empresa contendo o número e o tipo de kits solicitados, nome, endereço, e-mail, telefone e CNPJ ou CPF do médico solicitante. Posteriormente, a cada de testagem, foi criada uma nova solicitação *on-line* com o preenchimento do formulário de requisição com informações referentes aos critérios de elegibilidade, sobre o participante, o tipo de amostra e dados clínicos. Após o preenchimento, o formulário foi impresso, assinado e incluído no kit de coleta, a ser devolvido a empresa com a amostra do participante.

Tabela 4 - Descrição dos genes analisados nos participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica (ELA)

Gene	Transcrição	Gene	Transcrição
AL2	NM_020919.3	PDE8B	NM_003719.3
ANG	NM_001145.4	PFN1	NM_005022.3
ANXA11	NM_001157.2	PINK1	NM_032409.2
APP	NM_000484.3	PLA2G6	NM_003560.2
ATP13A2	NM_022089.3	PODXL	NM_005397.3
ATP7B	NM_000053.3	PRKN	NM_004562.2

CHCHD10	NM_213720.2	PRKRA	NM_003690.4
CHCHD2	NM_016139.2	PRNP*	NM_000311.3
CHMP2B	NM_014043.3	PSEN1	NM_000021.3
CSF1R	NM_005211.3	PSEN2	NM_000447.2
DCTN1	NM_004082.4	RAB39B	NM_171998.3
DDHD1	NM_001160147.1	SETX	NM_015046.5
DNAJC6	NM_001256864.1	SIGMAR1	NM_005866.3
ERBB4	NM_005235.2	SLC6A3	NM_001044.4
ERLIN1	NM_006459.3	SNCA	NM_000345.3
FBXO7	NM_012179.3	SOD1	NM_000454.4
FIG4	NM_014845.5	SORL1	NM_003105.5
FUS	NM_004960.3	SPG11	NM_025137.3
GBA*	NM_001005741.2	SPR	NM_003124.4
GCH1	NM_000161.2	SQSTM1	NM_003900.4
GRN	NM_002087.3	SYNJ1	NM_003895.3
HEXA	NM_000520.4	TARDBP	NM_007375.3
HNRNPA2B1	NM_031243.2	TBK1	NM_013254.3
ITM2B	NM_021999.4	TFG	NM_006070.5
KIF5A	NM_004984.2	TH	NM_199292.2
LRRK2	NM_1988578.3	TIA1	NM_022173.2
MAPT	NM_005910.5	TMEM230*	NM_001009923.1
MATR3	NM_199189.2	TREM2	NM_018965.3; NM_001271821.1
NEFH	NM_021076.3	UBQLN2	NM_013444.3
OPTN	NM_021980.4	UCHL1	NM_004181.4
PARK7	NM_007262.4	VAPB	NM_004738.4
		VCP	NM_007126.3

Fonte: Invitae® (2021).

A coleta da amostra biológica para a análise genética foi realizada no momento em que amostras de sangue foram coletadas para a mensuração dos parâmetros descritos no item 4.6.2. Após a coleta, um novo e-mail foi encaminhado para a empresa para solicitar a retirada da amostra e coordenar a coleta gratuita com o parceiro de logística, contendo as informações referentes a número e tipo do kit, nome, endereço, e-mail, telefone e CNPJ ou CPF do médico solicitante. Após o recebimento de confirmação de retirada de amostra, foi agendada a data e horário para a retirada do kit contendo a amostra biológica do participante, que foi entregue pessoalmente pelo médico responsável à transportadora parceira da empresa.

### **5.6.2 Determinação de parâmetros bioquímicos no sangue**

Os estudos de bioquímica-clínica realizados em amostra de sangue foram avaliados no laboratório de análises clínicas do HUPEST. Dentre dos parâmetros bioquímicos foram incluídos o perfil bioquímico da função hepática (determinação das atividades das enzimas AST e ALT, atividade das enzimas CPK e aldolase, glicemia (sem jejum), hemograma completo, tempo de protrombina (TAP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), velocidade de hemossedimentação (VHS), PCR, hormônio tireoestimulante (TSH) e dosagem de vitamina B12.

Neste estudo foi optado pela realização da *dosagem casual da glicemia*, tendo em vista o longo deslocamento até o hospital como também a utilização de gastrostomia por alguns destes indivíduos. Neste tipo de análise, em que a medida é realizar em qualquer momento do dia, sem jejum, os valores de referência normais são aqueles abaixo de 120 mg/dL.

### **5.6.3 Determinação das concentrações de neopterinina**

#### *5.6.3.1 Coleta das amostras*

As quantificações de intermediários metabólicos da síntese de BH4 foram realizadas em plasma. Estruturou-se um procedimento operacional padrão (POP) para a preparação, coleta e armazenamento das amostras, conforme mostrado no apêndice D.

As amostras de sangue foram coletadas por profissional especializado e pelo método da punção venosa em tubos de coleta de 4 mL que continham anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).

Os tubos contendo as amostras de sangue total foram centrifugados a 600 x *g* por 15 min a temperatura ambiente para separar o plasma, o qual foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido até o momento de realizar as determinações ou bem tratado como descrito no item 4.6.2. Nestas amostras foram quantificadas as concentrações de neopterinina.

#### *5.6.3.2 Preparação das amostras*

Considerando que BH4 é um composto com atividade redox, fotossensível, e instável a pH maior que 7 e a temperatura ambiente, o processamento das amostras foi realizado num ambiente sem luz direta, protegendo os tubos contendo as amostras biológicas da luz com papel alumínio ou em tubos de plástico foscos (preto ou âmbar), e refrigeradas no gelo para minimizar a oxidação da BH4.

A neopterina, por ser um metabólito mais estável, pôde ser mensurada em até meses após a coleta das amostras. No entanto, após o processamento, a quantificação deve ser imediata.

As alíquotas de plasma empregadas para a determinação de metabólito de BH4 foram tratadas com 1 volume (1:1, v/v) de ácido tricloroacético (TCA) 5 %, contendo ditioeritritol (DTE) 6,5 mM. A acidez gerada pela adição do ácido (TCA) e do antioxidante (DTE) auxilia na estabilidade das amostras. A seguir, as amostras foram centrifugadas a  $16.000 \times g$  por 10 min a 4 °C, e o sobrenadante foi utilizado para as mensurações.

#### 5.6.3.3 *Quantificação de neopterina*

As concentrações de neopterina plasmática foram determinadas por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) utilizando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (IBL International, Hamburgo, Alemanha). Esta metodologia já foi validada e empregada pelo nosso grupo (MARTINS *et al.*, 2018), e preferida quando se trata da quantificação deste metabólito no plasma devido à interferência que as proteínas plasmáticas provocam na técnica do HPLC.

As concentrações de neopterina foram estimadas por interpolação a partir de uma curva padrão por medidas colorimétricas a 450 nm (comprimento de onda de correção de 540 nm) em um leitor de placa ELISA (SpectraMax®). Os ensaios foram sensíveis a 0,7 nmol/L de neopterina.

## 5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

No tratamento dos dados foram utilizadas medidas de estatística descritiva, caracterizando-se os resultados de cada uma das variáveis através de percentagens, médias, desvio padrão, medianas e intervalo interquartil, tendo-se comparado as variáveis contínuas com o teste paramétrico  $t$  de student e as variáveis discretas com o teste não paramétrico Mann-Whitney.

Os dados referentes às variáveis independentes e dependente, recolhidos pelos instrumentos aplicados, foram analisados através da estatística inferencial após a realização do teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov para analisar a normalidade de distribuição da amostra populacional em estudo.

As variáveis contínuas foram descritas com medidas de tendência central e dispersão e comparadas através dos testes  $t$  de Student ou Mann-Whitney quando apropriado.

As variáveis categóricas foram descritas em números absolutos e percentuais. O *coeficiente*  $r$  de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a presença de correlação entre variáveis contínuas. Valores de  $P$  menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Os resultados emergentes deste projeto foram organizados em tabelas Office Excel 2021 e analisados utilizando-se o programa GraphPadPrism 9 (San Diego, CA, EUA, 2009) para composição de gráficos e avaliação estatística.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 PERFIL DOS PARTICIPANTES: CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL CLÍNICO E EPIDEMIOLÓGICO

Inicialmente, para caracterizar o perfil dos sujeitos de estudo avaliou-se as seguintes variáveis sociodemográficas: idade, sexo, cidade de domicílio, estado civil, cor de pele referida pelo participante, grau de escolaridade, tabagismo, uso e abuso de álcool, casos familiares de ELA, e consanguinidade dos pais.

Pode ser observado na Figura 6 que os participantes advieram de 17 diferentes municípios do estado de Santa Catarina, sendo 8,1 % da mesorregião Sul Catarinense, 21,6 % da mesorregião do Vale do Itajaí, e a maioria dos participantes, representados por 62,2 %, da mesorregião da Grande Florianópolis, com 37,8 % do município de Florianópolis.

A Tabela 5 mostra que 54,1 % dos participantes foram do sexo masculino, mostrando uma relação de sexo masculino/feminino de aproximadamente 1,2:1. A idade média dos participantes foi de aproximadamente 61,2 anos, variando entre 43 a 74 anos. Destes, um total de 29 participantes possuíam relação civil identificada como casados. Considerando a cor de pele referida pelo sujeito de estudo, a maioria era branca (92 %), enquanto o grau de escolaridade apresentou uma média de 11,6 anos, representando uma média acima dos anos de ensino médio. Obteve-se que 13,5 % dos integrantes eram tabagistas e 29,7 % apresentavam uso abusivo de álcool.

Tabela 5 - Perfil sociodemográfico dos participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica (ELA)

<b>Variáveis</b>	<b>N = 37 (%)</b>
<b>Sexo biológico</b> (Masculino)	20 (54,1)
<b>Idade, em anos<sup>a</sup></b>	61,2 ± 7,4
<b>Estado civil</b>	
Casado	29 (78,4)
Solteiro	1 (2,7)
Viúvo	1 (2,7)
Divorciado	4 (10,8)
União estável	2 (5,4)
<b>Cor de pele referida</b>	
Branca	34 (91,9)
Parda	2 (5,4)
Amarela	1 (2,7)
<b>Nível educacional, em anos<sup>a</sup></b>	11,6 ± 5



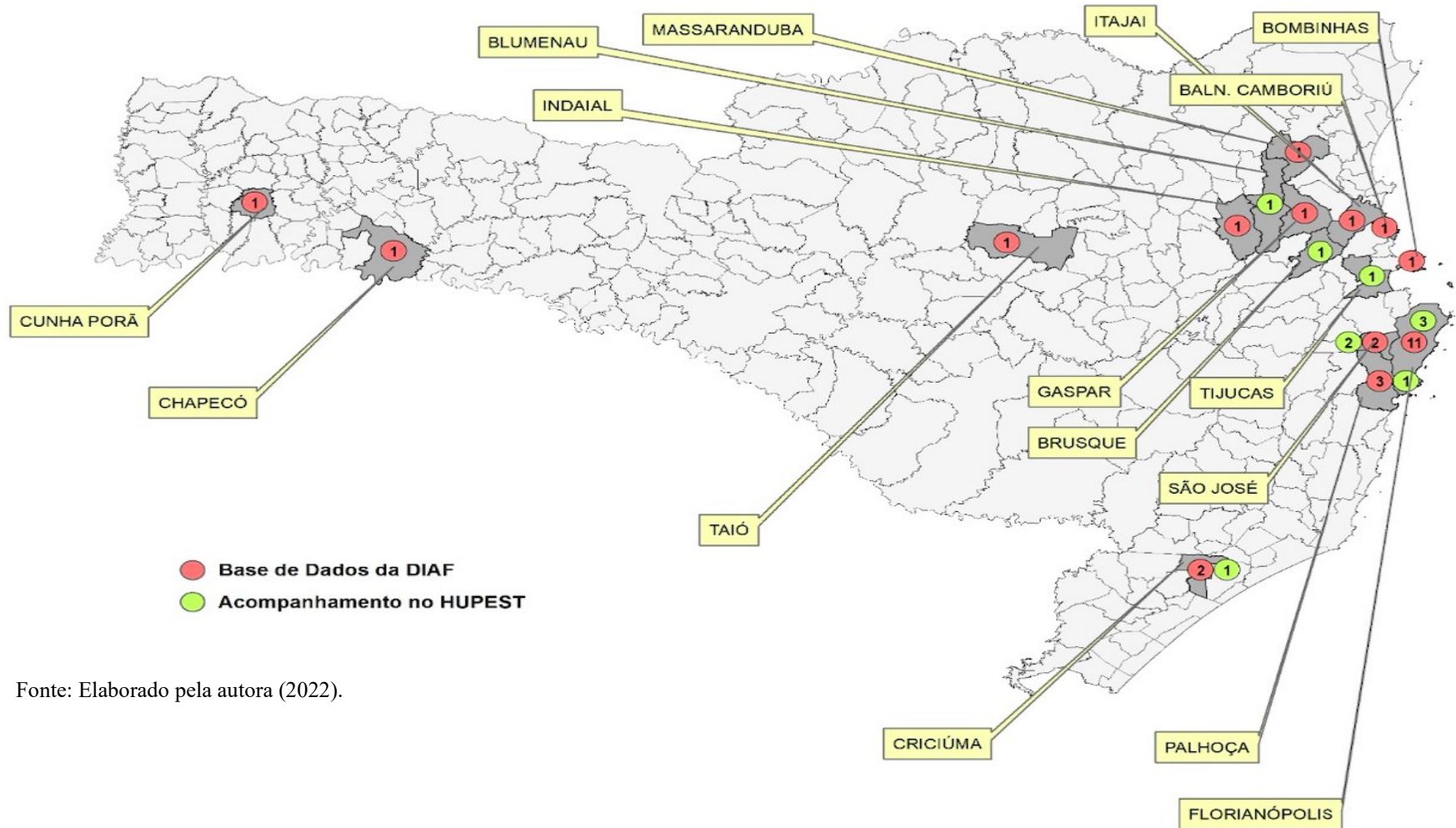
<b>Tabagismo</b>	5 (13,5)
<b>Abuso do uso de álcool</b>	11 (29,7)
<b>Casos familiares em ELA</b>	5 (13,5)
<b>Terapia com riluzol</b>	32 (86,5)

---

<sup>a</sup>média ± desvio padrão

Fonte: Elaborada pela autora (2022)

Figura 6 - Distribuição regional dos participantes de estudo afetados por esclerose lateral amiotrófica no Estado de Santa Catarina. O maior percentual de participantes proveio da mesorregião da Grande Florianópolis, principalmente pelo município de Florianópolis, seguido das mesorregiões do Vale do Itajaí e do Sul Catarinense. Os números dentro do círculo vermelho representam os participantes recrutados através da diretoria de assistência farmacêutica (DIAF), enquanto aqueles dentro do círculo em verde, representam os participantes que se encontravam em acompanhamento clínico regular no ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HUPEST), da Universidade Federal de Santa Catarina.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A Tabela 5 ainda mostra que cinco participantes possuíam algum familiar com história de ELA; entretanto, nenhum dos participantes relatou consanguinidade dos pais. Quanto ao tratamento farmacológico com riluzol, a maioria dos participantes (86,5 %) encontrava-se sob este tratamento farmacológico.

## 6.2 CARACTERIZAÇÃO DOS DADOS CLÍNICOS

A Tabela 6 descreve a apresentação clínica dos sujeitos de estudo. Pode ser observado na tabela que a idade média do início dos sintomas foi de 56,8 anos, enquanto a mediana de tempo entre o início dos primeiros sintomas e o diagnóstico e o tempo de duração da doença até a data da entrevista, foram, respectivamente, de 12 e 38 meses, tendo sido observado 11 participantes com mais de 7 anos de sobrevida após o diagnóstico. A média de tempo entre o início dos primeiros sintomas e o diagnóstico foi menor na ELA de início bulbar com  $12,1 \pm 5,1$  meses.

Tabela 6 - Características clínicas dos participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica (ELA)

<b>Variáveis clínicas</b>	<b>N = 37 (%)</b>
<b>Idade do início dos sintomas, em anos<sup>a</sup></b>	56,8 ± 9,4
<b>Tempo entre o início dos sintomas ao diagnóstico, em meses<sup>b</sup></b>	12 (6 - 18)
<b>Tempo de evolução da doença, em meses<sup>b</sup></b>	38 (17 - 81)
<b>Primeiro sintoma relatado</b>	
Fraqueza em membro	16 (43,2)
Superior proximal	8 (21,6)
Superior distal	8 (21,6)
Membro inferior	13 (35,1)
Dispneia	1 (2,7)
Disfagia	2 (5,4)
Disartria	5 (13,5)
<b>Envolvimento inicial em membro</b>	29 (78,4)
Membro superior direito	13 (35,1)
Membro inferior direito	5 (13,5)
Membro superior esquerdo	3 (8,1)
Membro inferior esquerdo	8 (21,6)
<b>Câimbras</b>	25 (67,6)
Em membros inferiores	23 (92)
<b>Fenótipo</b>	
Bulbar	8 (21,6)
Espinhal	29 (78,4)
<b>Categorias clínicas na ELA</b>	
ELA de início espinhal	19 (51,3)
Cervical	7 (19)
Lombar	12 (32,4)

ELA de início bulbar	8 (21,6)
Atrofia muscular progressiva	1 (2,7)
Esclerose lateral primária	2 (5,4)
Síndrome de <i>flail leg</i>	2 (5,4)
Síndrome de <i>flail arm</i>	4 (10,8)
Síndrome ELA <i>plus</i> com sinais extrapiramidais	2 (5,4)
<b>Critérios de Awaji-Shima</b>	
Clinicamente definitiva	22 (59,5)
Clinicamente provável	9 (24,3)
Clinicamente possível	6 (16,2)
<b>Estado de saúde na ELA (ALSHSS)</b>	
Leve	12 (32,4)
Moderada	13 (35,1)
Severa	4 (10,8)
Terminal	8 (21,6)
<b>Índice de massa corporal (kg/m<sup>2</sup>)<sup>a</sup></b>	25,2 ± 4,2
<b>Escala revisada de avaliação funcional (ALSFRS-R/BR)<sup>a</sup></b>	
Bulbar	8,3 ± 4,2
Motor fino	5,8 ± 5,1
Tronco	6,4 ± 4,2
Respiratório	11,0 ± 3,1
<b>Escore médio total</b>	30,3 ± 13,2
<b>Questionário de avaliação da ELA (ALSAQ-40/BR)</b>	
Mobilidade física <sup>a</sup>	53,0 ± 33,0
Atividade de vida diária e independência <sup>a</sup>	60,4 ± 36,5
Alimentação e deglutição <sup>b</sup>	8,3 (0 - 41,7)
Comunicação <sup>a</sup>	49,1 ± 37,4
Reações emocionais <sup>a</sup>	45,3 ± 22,1
<b>Escore médio total<sup>a</sup></b>	47,2 ± 21,8
<b>Escala de sonolência diurna de Epworth<sup>a</sup></b>	6,0 ± 4,5
<b>Sintomas relacionados a ventilação</b>	
Dispneia em esforço	11 (29,7)
Despertares noturnos	8 (21,6)
Sonhos vívidos	6 (16,2)
Cefaléia matinal	7 (19)
Sonolência diurna	21 (56,8)
Fadiga	23 (62,2)
<b>Capacidade vital forçada (CVF)<sup>a</sup> %</b>	69,3 ± 20,2
<b>Tipo de intervenção</b>	
Gastrostomia	6 (16,2)
Traqueostomia	3 (8,1)
Ventilação mecânica	4 (10,8)
Uso de <i>BiPAP</i>	7 (19)

<sup>a</sup>média ± desvio padrão; <sup>b</sup>mediana (intervalo interquartil); *BiPAP*: *Bilevel positive pressure airway*

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

A fraqueza em membros superiores foi o sintoma mais frequentemente relatado pelos participantes (43,2 %), apresentando igual distribuição para sintomas proximais e distais. No entanto, em 35,1% dos indivíduos o membro inicialmente mais acometido foi o superior direito. A Tabela 6 ainda mostra que 67,6 % dos participantes apresentaram câimbras, sendo que a maioria (92%) era

localizada em membros inferiores, sendo a câimbra o primeiro sintoma percebido pelo indivíduo em 48 % dos casos.

O fenótipo da doença baseado no primeiro segmento corporal afetado permitiu caracterizar o grupo de estudo como sujeitos afetados principalmente por ELA de início espinhal (78,4%). Quando os participantes foram categorizados clinicamente foi observado que a maioria dos casos se apresentaram como ELA de início lombar (32,4%), seguido da ELA de início bulbar (21,6%), e de ELA de início cervical (16,2%) com 10,8% dos casos como apresentação de síndrome de *flail arm*. As outras categorias clínicas apresentaram percentuais menores que 5 %.

Com o intuito de avaliar sistematicamente os vários aspectos de saúde dos participantes do estudo, recorreu-se a medidas e testes objetivos, padronizados, sob a forma de escala de medidas, que foram utilizadas para a mensuração do IMC, critérios diagnósticos, estado de saúde, avaliação funcional, qualidade de vida e sonolência diurna.

Quando considerados os critérios eletrodiagnósticos do consenso de Awaji-Shima, a Tabela 6 mostra que a maioria dos participantes (59,5 %) preencheu critérios para ELA clinicamente definida, enquanto 24,3 % de ELA clinicamente provável e 16,2 % de ELA clinicamente possível.

Quando aplicada a escala ALSHSS, desenvolvida para classificar e identificar os estados clínicos de saúde (capacidade do indivíduo em falar, deambular e realizar atividades de membros superiores de vida diária), foi observado que 35,1 % dos sujeitos do estudo tiveram estas atividades comprometidas de forma moderada, 32,4 % de forma leve, 16,2 % de forma terminal e só dois indivíduos comprometidos de forma severa. Quando divididos por sexo e idade, conforme demonstrado na Tabela 7, percebeu-se um predomínio de ELA no sexo masculino em ELA clinicamente definitiva em 59 % dos casos e ELA clinicamente provável em 66,6 %, além de predomínio feminino em ELA clinicamente possível com 83,3 % dos indivíduos deste critério. Todavia, a escala ALSHSS demonstrou que 58,3 % dos acometidos com estado leve pertenciam ao grupo do sexo feminino, e 77,0 % no estado moderado eram do sexo masculino. Pode-se ainda observar na tabela que os participantes do sexo masculino apresentam uma média de idade menor no estágio terminal.

Tabela 7 - Distribuição dos critérios de Awaji-Shima e escala de estado de saúde da ELA (ALSHSS) de acordo com sexo e idade em participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica (ELA)

Variáveis	Participantes (N = 37)		Idade (média ± desvio padrão)	
	F	M	F	M
<b>Crítérios de Awaji-Shima</b>				
ELA clinicamente definida	9	13	60,1 ± 10,4	59,8 ± 7,1
ELA clinicamente provável	3	6	59,3 ± 3,2	64,7 ± 5,3
ELA clinicamente possível	5	1	64,6 ± 6,1	56 <sup>a</sup>
<b>ALSHSS</b>				
Leve	7	5	59,6 ± 6,0	63,8 ± 9,1
Moderada	3	10	65,3 ± 13,3	61,8 ± 4,8
Severa	3	1	61,3 ± 2,9	63 <sup>a</sup>
Terminal	4	4	61,2 ± 12,2	55,2 ± 6,7

<sup>a</sup>um único participante; ALSHSS: escala de estado de saúde da ELA

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

A média obtida dos valores de IMC (Tabela 6) dos participantes foi de  $25,2 \pm 4,2$ , maiores do que os valores de IMC considerados como normal ( $18,5 - 24,9$ ) segundo critérios definidos pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1986). Além disso, cinco participantes foram categorizados como portadores de obesidade.

A Tabela 6 mostra que a escala de avaliação funcional ALSFRS-R/BR sob os domínios bulbar, motor fino, motor bruto e função respiratória, apresenta um escore total que varia de 0 a 48 pontos, onde maiores pontuações indicam menor incapacidade. Os participantes do estudo mostraram uma pontuação média total de 30,3, correspondendo a uma funcionalidade global de 63,1 %. Quando esse valor foi subclassificado, as pontuações médias para a subescala respiratória foram no valor de  $11,0 \pm 3,1$ , na bulbar de  $8,3 \pm 4,2$ , seguidos dos motores fino e tronco, em 5,9 e 6,4 pontos, respectivamente.

Como instrumento de avaliação da qualidade de vida foi utilizada a escala de ALSAQ-40/BR, que avalia os domínios de mobilidade, atividades da vida diária, alimentação e deglutição, comunicação e aspectos emocionais. A pontuação da escala varia entre 0 e 100 dentro de cada domínio, e quanto mais próximo de 100, maior comprometimento na qualidade de vida. De acordo com a pontuação total, classifica-se em: não apresenta dificuldade (0 -19 pontos); raramente (20 - 39 pontos); às vezes (40 - 59 pontos); frequentemente (60 - 79 pontos) e sempre apresenta dificuldades (80 - 100 pontos). Pode ser observado

que os participantes apresentaram escore geral de  $47,2 \pm 21,8$ , variando entre 11,5 e 88,6 pontos.

Na contagem dirigida ao domínio mobilidade física foi observado o valor médio de  $53 \pm 33$ , mostrando haver dificuldades às vezes. Entretanto, para as atividades da vida diária e independência, frequentemente ( $60,4 \pm 36,5$ ) foi encontrada dificuldade nestes itens. No quesito alimentação e deglutição, refletiu-se uma rara dificuldade ( $27,9 \pm 39,6$ ), com a mediana obtida em 8,3 (0 - 41,7). Finalizando a distribuição dos dados, os domínios comunicação e aspectos emocionais, apresentaram escores médios de  $49,1 \pm 37,4$  e  $45,3 \pm 22,1$ , respectivamente, refletindo uma frequente dificuldade nesta escala.

Os instrumentos de avaliação ALSFRS/BR, ALSAQ-40/BR e a CVF foram subdivididos segundo o fenótipo, sexo, e idade no início dos sintomas (Tabela 8). Apesar das amostras das subpopulações serem pequenas, não se identificou diferenças entre os fenótipos para ALSFRS/BR e CVF. Outrossim, percebeu-se uma tendência a maior pontuação nos fenótipos bulbares, sendo pior no sexo feminino, na escala de ALSAQ-40/BR, refletindo pior qualidade de vida.

Tabela 8 - Distribuição do fenótipo clínico quanto a sexo, idade e instrumentos de avaliação em em participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica (ELA)

Variáveis	N		Idade de início dos sintomas <sup>a</sup>		CVF (%) <sup>b</sup>		ALSFRS-R/BR <sup>b</sup>		ALSAQ-40/BR <sup>b</sup>	
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
<b>Fenótipo</b>										
Bulbar	6	2	58,2 ± 11,5	64,0 ± 8,5	68,2	69	28,2	28,5	61,1	53,7
Espinhal	11	18	56,4 ± 10,1	55,7 ± 8,6	60	71,8	29,6	31,5	46,3	42,3

<sup>a</sup>média ± desvio padrão; <sup>b</sup>média; CVF: Capacidade Vital Forçada; ALSFRS-R/BR: Escala revisada de avaliação funcional; ALSAQ-40/BR: questionário de avaliação de qualidade de vida da ELA

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

De acordo com a Tabela 6, pode se observar que os participantes apresentaram valores médios na escala de sonolência diurna de *Epworth* considerados como normais (BERTOLAZI *et al.*, 2009). No entanto, quando os participantes foram interrogados acerca dos sintomas relacionados a ventilação, a sonolência diurna excessiva foi relatada em 56,8 %, fadiga em 62,2 %, dispneia em esforço em 29,7 %, e despertares noturnos em 21,6 % dos casos. Em relação ao item relacionado a sonhos vívidos e cefaleia matinal, seis e sete participantes apresentaram estas características, respectivamente. Ainda, identifica-se uma média da CVF de 69,3 ± 20,2, também considerado normal, sendo menores em mulheres (64,7 ± 24,2) que homens (71,4 ± 18,4).

A Tabela 6 também mostra que ao longo do desenvolvimento da doença os participantes necessitaram realizar intervenções cirúrgicas para correção da dificuldade de deglutição e risco de aspiração. Do total dos sujeitos de estudo, seis participantes necessitaram realizar o procedimento cirúrgico de gastrostomia e três de traqueostomia. Ainda, devido a variados graus de distúrbios ventilatórios apresentados pelos sujeitos, 11 % dos casos requereram ventilação mecânica invasiva, enquanto 19 % dos participantes utilizaram o dispositivo *BiPAP*.

Com o intuito de investigar uma possível relação entre a dieta e a doença, foi realizado um inquérito alimentar onde foi aplicado o questionário de frequência alimentar MFFQ. A partir destes dados observou-se que os participantes não seguiram nenhum tipo de dieta específica durante mês que antecedeu o dia da inclusão neste estudo. Apenas cinco participantes fizeram algum tipo de dieta alimentar nos últimos cinco anos, e quatro não utilizavam nenhum tipo de dieta oral, devido a utilização exclusiva de dieta por gastrostomia (3) e sondagem nasoenteral (1).



A Tabela 9 mostra que a distribuição de ingestão semanal de alimentos ocorreu com uma frequência maior que 3 vezes com frutas e vegetais em 87,9 % dos indivíduos, nos laticínios em 81,8 % e carnes vermelhas em 57,6 % dos casos. Todavia, o consumo com uma frequência de 1 a 3 vezes na semana foi relatado com a ingestão de peixes em 90,9 % dos participantes, *fast food* em 75,7 % dos casos, alimentos fritos em 63,6 % e em mais que 50 % dos participantes com o consumo de aves.

Tabela 9 - Distribuição da frequência de ingestão semanal de alimentos dos participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica (N = 33)

<b>Tipo de alimento</b>	<b>Nunca N (%)</b>	<b>1 a 3 vezes N (%)</b>	<b>Mais 3 vezes N (%)</b>
Carne vermelha	0	14 (42,4)	19 (57,6)
Aves	1 (3,0)	19 (57,6)	13 (39,4)
Peixe	2 (6,1)	30 (90,9)	1 (3,0)
Laticínios	0	6 (18,2)	27 (81,8)
Vegetais	0	4 (12,1)	29 (87,9)
Frutas	1 (3,0)	3 (9,1)	29 (87,9)
<i>Fast food</i>	6 (18,2)	25 (75,7)	2 (6,1)
Sobremesas	6 (18,2)	15 (45,4)	12 (36,4)
Bebidas doces	4 (12,1)	14 (42,4)	15 (45,5)
Alimentos fritos	5 (15,2)	21 (63,6)	7 (21,2)
Bebida alcoólica	13 (39,4)	17 (51,5)	3 (9,1)

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

As análises de correlações entre as variáveis clínicas podem ser observadas na Tabela 10. Constatou-se correlações positivas fortes existentes entre o tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico e a duração da doença e correlações positivas moderadas de tempo entre o início dos sintomas ao diagnóstico e o tempo de câimbras e o tempo de câimbras com a duração da doença. Todavia, encontrou-se correlações negativas moderadas entre a idade de início dos sintomas com o tempo entre o início dos sintomas ao diagnóstico e com a duração da doença.

Tabela 10 - Análise das correlações entre variáveis clínicas em participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica.

Variáveis	<i>r</i> de Pearson	Valor de <i>P</i>
Idade de início dos sintomas X tempo entre o início dos sintomas ao diagnóstico	- 0,48	0,02
Idade de início dos sintomas X duração da doença	- 0,61	0,00005
Tempo entre o início dos sintomas ao diagnóstico X duração da doença	0,84	< 0,00001
Tempo entre o início dos sintomas ao diagnóstico X tempo de câimbras	0,54	0,004
Duração da doença X tempo de câimbras	0,45	0,02

Valores de 1 no *r* de Pearson representam a máxima correlação positiva; valores de -1 representam a máxima correlação negativa, ou inversa.

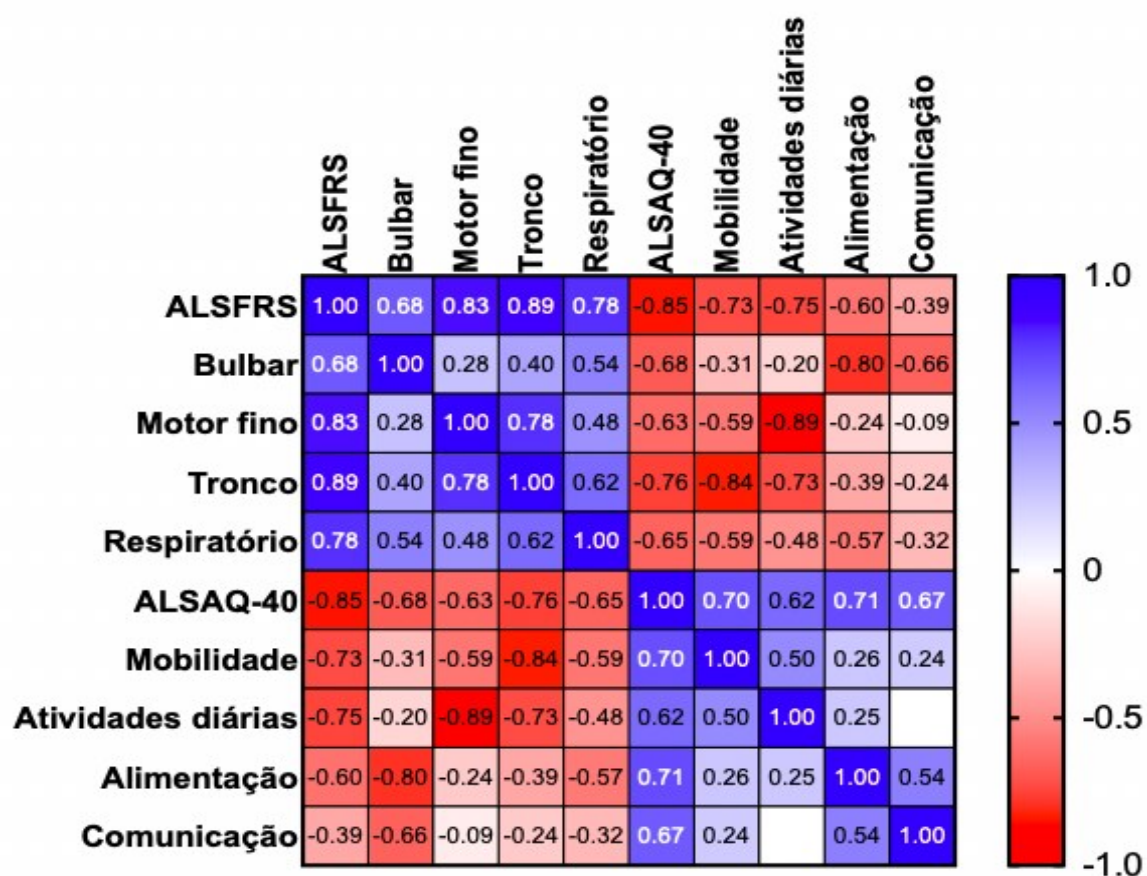
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Conforme ilustrado no mapa de calor da Figura 7, a partir dos valores das correlações *r* de Pearson, demonstra-se que o instrumento de avaliação ALSAQ-40/BR correlacionou-se negativamente com todos os parâmetros da escala de ALSFRS, em especial as subescalas tronco [ $r = - 0,76$ ;  $p < 0,001$ ] e respiratório [ $r = - 0,65$ ;  $p < 0,001$ ] e ao escore total [ $r = - 0,85$ ;  $p < 0,001$ ]. Além disto, observou-se correlação significativa entre ALSAQ-40/BR e a escala de sonolência diurna de Epworth [ $r = 0,49$ ,  $p < 0,001$ ].

Da mesma forma, a maioria das subescalas de ALSFRS-BR apresentou correlação negativa com as subescalas de ALSAQ-40/BR, bem como o escore total, com destaque para aquelas fortemente negativas, como o escore total de ALSFRS BR com as subescalas da ALSAQ-40/BR de mobilidade [ $r = - 0,73$ ;  $p < 0,001$ ] e atividades de vida diária (AVD) [ $r = - 0,75$ ;  $p < 0,001$ ].

Ainda nesta temática, as correlações das subescalas ALSFRS e ALSAQ-40/BR, respectivamente, que apresentaram correlações fortemente negativas foram as subescalas bulbar e alimentação [ $r = - 0,80$ ;  $p < 0,001$ ]; motor fino e AVD [ $r = - 0,89$ ;  $p < 0,001$ ] e tronco com mobilidade [ $r = - 0,84$ ;  $p < 0,001$ ] e com AVD [ $r = 0,73$ ;  $p < 0,001$ ].

Figura 7 - Instrumentos de avaliação clínica em participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica utilizando o mapa de calor com escala de cor contínua. O mapa de calor foi gerado pelo GraphPad Prism 9, utilizando os valores de correlação  $r$  de Pearson após a análise estatística. Valores de 1 representam a máxima correlação positiva; valores de -1 representam a máxima correlação negativa, ou inversa. ALSFRS= escala de avaliação funcional revisada da ELA para a língua portuguesa; Bulbar, Motor fino, Tronco e Respiratório são subescalas de divisão da escala ALSFRS-R/BR, ALSAQ-40= questionário de avaliação de qualidade de vida da ELA; Mobilidade, Atividades diárias, Alimentação e Comunicação são subescalas da escala ALSAQ-40/BR.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

### 6.3 ANÁLISES DE MARCADORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS NOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

#### 6.3.1 Mensuração dos exames genéticos

De acordo com os resultados analisados, apenas dois casos dos 37 participantes foram positivos para alguma das mutações estudadas. O primeiro caso foi portador de duas mutações, uma no gene *FUS* (do Inglês, *fused in sarcoma*) (c.1561C>T (p.Arg521Cys)) e outra no gene *PRNP* (proteína

relacionada ao prion) (c.538G>A (p.Val180Ile)), sendo esta com baixa penetrância e não relacionada a ELA. O segundo caso apresentou a mutação no gene *PRKN* (gene parkin) (c.823C>T (p.Arg275Trp)), e foi descrita como carreadora e não relacionada a ELA.

A Tabela 11 mostra que os participantes apresentaram 27 variantes de significado incerto (VUS). O 54,1% dos participantes apresentaram apenas VUS, seis participantes com duas VUS distintas, e os restantes (75 %) com uma única variante. Ainda, nenhuma das VUS descritas entre os participantes se encontraram repetidas correspondendo, cada uma delas a 3,7% da amostra. Em um único caso foi observada a associação de uma mutação gênica e a presença de uma VUS.

Tabela 11 - Distribuição das variantes de significado incerto em participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica

Gene	Variante	Zigosidade	N (%)
ALS2	c.1433G>C (p.Gly478Ala)	Heterozigoto	1 (3,7%)
ANXA11	c.399G>T (p.Met133Ile)	Heterozigoto	1 (3,7%)
ATP13A2	c.196C>T (p.Arg66Cys)	Heterozigoto	1 (3,7%)
	c.395C>T (p.Ala132Val)	Heterozigoto	1 (3,7%)
ATP7B	c.3409G>A (p.Val1137Met)	Heterozigoto	1 (3,7%)
	c.157C>T (p.Pro53Ser)	Heterozigoto	1 (3,7%)
DCTN1	c.3430C>A (p.Pro1144Thr)	Heterozigoto	1 (3,7%)
DNAJC6	c.1990A>G (p.Ser664Gly)	Heterozigoto	1 (3,7%)
ERBB4	c.3115G>A (p.Ala1039Thr)	Heterozigoto	1 (3,7%)
GCH1	c.452A>G (p.Lys151Arg)	Heterozigoto	1 (3,7%)
KIF5A	c.566C>T (p.Ser189Leu)	Heterozigoto	1 (3,7%)
LRRK2	c.614A>G (p.Tyr205Cys)	Heterozigoto	1 (3,7%)
MAPT	c.715G>A (p.Ala239Thr)	Heterozigoto	1 (3,7%)
NEFH	c.2200G>A (p.Glu734Lys)	Heterozigoto	1 (3,7%)
PLA2G6	c.91G>A (p.Asp31Asn)	Heterozigoto	1 (3,7%)
	c.550_561del (p.Phe184_Ala187del)	Heterozigoto	1 (3,7%)
SIGMAR1			
SLC6A3	c.1155C>T (Silent)	Heterozigoto	1 (3,7%)
SOD1	c.272A>C (p.Asp91Ala)	Heterozigoto	1 (3,7%)
SORL1	c.2653C>A (p.Pro885Thr)	Heterozigoto	1 (3,7%)
	c.5873C>G (p.Ser1958Cys)	Heterozigoto	1 (3,7%)
SPG11	c.2065G>A (p.Glu689Lys)	Heterozigoto	1 (3,7%)
	c.6878G>A (p.Arg2293Gln)	Heterozigoto	1 (3,7%)
TBK1	c.64A>G (p.Asn22Asp)	Heterozigoto	1 (3,7%)
	c.527C>T (p.Thr176Ile)	Heterozigoto	1 (3,7%)
TIA1	c.820A>T (p.Ile274Phe)	Heterozigoto	1 (3,7%)

TREM2	c.433G>T (p.Gly145Trp)	Heterozigoto	1 (3,7%)
VPS13C	c.9526C>T (p.Arg3176Cys)	Heterozigoto	1 (3,7%)

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

### 6.3.1.1 Mensuração de parâmetros bioquímicos no sangue

A Tabela 12 apresenta análises bioquímicas-clínicas mensuradas para acompanhar as condições de saúde dos participantes do estudo. A maioria das análises bioquímicas se encontraram dentro de valores referenciais, incluindo as atividades da ALT e da aldolase, os níveis de glicose e vitamina B12, o hemograma completo, TAP e TTPA.

No mesmo sentido, a mediana das atividades de AST e da CPK, VHS, PCR e níveis de TSH também se encontraram dentro dos valores considerados normais. Aponta-se, todavia, que, apesar da análise descritiva apresentar valores considerados normais, a análise de correlações mostrou correlações fortemente positivas entre os valores de atividade da aldolase e da ALT [ $r = 0,83$ ;  $p < 0,001$ ] e AST [ $r = 0,86$ ;  $p < 0,001$ ] e correlações significativamente positivas entre os valores de aldolase e atividade de CPK [ $r = 0,58$   $p < 0,01$ ], bem como entre atividade de CPK e ALT [ $r = 0,4$ ;  $p < 0,05$ ] e AST [ $r = 0,52$ ;  $p < 0,001$ ].

Tabela 12 - Parâmetros bioquímicos-clínicos dos participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica

Parâmetros bioquímicos	N	Média ± desvio padrão	Valor referencial
Atividade da aspartato aminotransferase (U/L) <sup>a</sup>	37	27 (21 - 33)	10 – 40
Atividade da alanina aminotransferase (U/L)	37	29,1 ± 14,2	14 – 63
Atividade da creatinofosfoquinase (U/L) <sup>a</sup>	37	194 (88 - 313)	26 – 308
Níveis de glicose (mg/dL)	34	108,2 ± 38,2	< 120
Contagem de eritrócitos (milhões/mm <sup>3</sup> )	37	4,6 ± 0,7	3,9 - 5,7
Concentração de hemoglobina (g/dL)	37	13,8 ± 1,5	11,5 – 18
Hematócrito (%)	37	42,0 ± 4,4	36 – 51
Volume corpuscular médio (µm <sup>3</sup> )	37	89,3 ± 15,1	80 – 100
Contagem total de leucócitos (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	37	7.120 ± 2.517	3.800 – 11.000
Contagem de plaquetas (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	37	249.756 ± 61.724	150.000 – 440.000
Proteína C reativa (mg/L) <sup>a</sup>	35	2,8 (1,2 - 5,8)	< 3
Tempo de protrombina (s)	37	11,1 ± 0,9	10 – 14
Tempo de tromboplastina parcial ativada (s)	35	26,3 ± 1,8	24 – 40
Níveis do hormônio tireoestimulante (mUI/L) <sup>a</sup>	37	2 (1,4 – 2,7)	0,5 - 4,7

Velocidade de hemossedimentação (mm/h) <sup>a</sup>	37	6 (4 - 27)	< 10
Atividade da aldolase (U/L)	23	3,9 ± 2,0	< 7,6
Níveis de vitamina B12 (pg/mL)	37	1.048 ± 612	211 – 911

<sup>a</sup>mediana (intervalo interquartil)

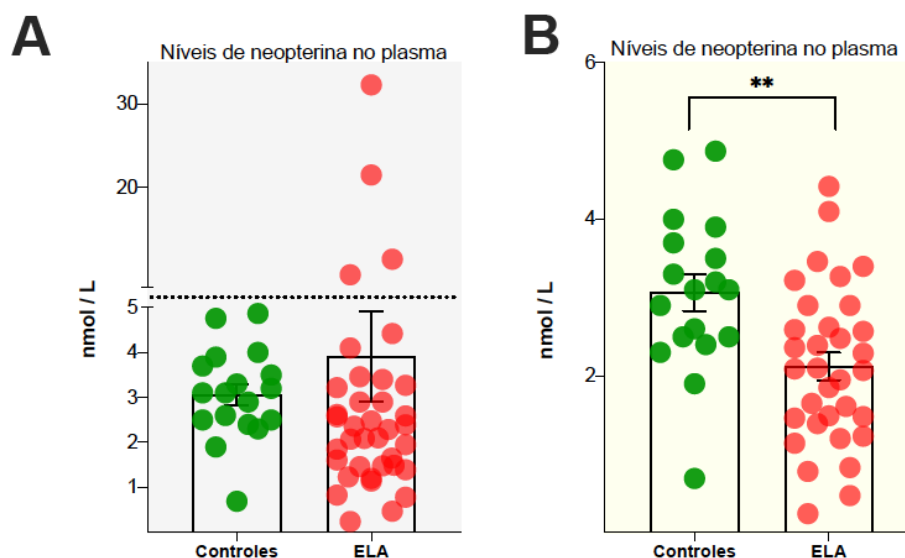
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

### 6.3.2 Mensuração das concentrações plasmáticas de neopterinina

A Figura 8 (A e B) apresenta as concentrações de neopterinina no plasma dos sujeitos participantes no estudo. Para efeitos de comparação com uma população saudável, as concentrações de neopterinina foram comparadas com um grupo de voluntários sadios, como pode ser observado na Tabela 13 (descritos na seção de Material e Métodos). Pode ser observado na figura 8.A que apenas alguns participantes apresentaram valores superiores ao grupo de voluntários sadios.

No entanto, a maioria dos participantes com ELA apresentou valores menores do que o grupo considerado como controle. Se quatro *outliers* não forem considerados na análise estatística, pode ser observada uma redução significativa dos valores de neopterinina no plasma dos participantes acometidos por ELA [ $t_{(49)} = 3,22$ ;  $p < 0,01$ ]. Ainda, se esses quatro *outliers* (valores de neopterinina de 9,5, 11,38, 21,51, e 32,33 nmol/L) não forem considerados, a amostra populacional se torna com distribuição gaussiana (todos os testes de normalidade a seguir tiveram um  $p > 0,05$  com a exclusão dos *outliers*: Anderson-Darling, D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov) como mostra a figura 8.B.

Figura 8 - **A.** Concentrações de neopterin no plasma de participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica (ELA) comparados com voluntários saudáveis (Controles), pareados por idade e sexo. Neste gráfico todos os dados observados foram considerados, incluindo os *outliers*. **B.** Concentrações de neopterin plasmática após a retirada de quatro *outliers*, cujos valores se distanciaram do padrão da normalidade. \*\*  $p < 0,01$ , Controles vs. ELA, teste *t* de Student.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Foi aplicado o teste *t* nos valores de neopterin plasmática e desta forma, percebeu-se que as concentrações de neopterin não apresentaram correlação com a idade [ $r = -0,051$   $p > 0,05$ ] nem com o sexo [ $t(31) = 1,66$ ;  $p > 0,05$ ]. Estes resultados foram invariáveis quando incluídos os *outliers*.

A Figura 8B mostra as concentrações de neopterin plasmática em participantes afetados por ELA após a retirada dos quatro *outliers*, incluindo um participante com ELA familiar com valores de neopterin de 1,6 nmol/L. Nota-se que todos os participantes apresentam valores de neopterin abaixo de 5 nmol/L, mostrando que os valores plasmáticos deste metabólito são independentes da composição do genoma.

Tabela 13. Valores de neopterina plasmática no grupo de voluntários saudáveis (grupo controle)

Idade	Sexo	Neopterina (nmol/L)
66	feminino	2,4
55	masculino	2,5
57	feminino	2,9
60	masculino	2,6
73	feminino	3,1
59	feminino	2,5
74	masculino	3,7
43	masculino	3,1
68	feminino	3,9
64	feminino	3,5
55	masculino	3,2
53	masculino	3,3
48	feminino	4
68	feminino	1,9
66	masculino	2,3
63	feminino	0,69
57	feminino	4,87
76	feminino	4,76

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

As correlações dos valores de neopterina no plasma dos sujeitos do estudo com as escalas ALSFRS/BR e ALSAQ-40/BR estão demonstradas na Tabela 14. Esta análise evidencia correlações positivas entre os valores de neopterina e a subescala tronco (da escala ALSFRS/BR) e correlação moderadamente negativa dos valores de neopterina e a subescala de mobilidade (da escala ALSAQ-40/BR).

Tabela 14 - Análise das correlações entre as concentrações de neopterina plasmática e instrumentos de avaliação clínica em participantes afetados por esclerose lateral amiotrófica.

Variáveis	<i>r</i> de Pearson	Valor de <i>P</i>
ALSFRS-R/BR – subescala tronco	0,34	0,05
ALSAQ-40/BR – subescala mobilidade	- 0,40	0,02

Valores de 1 no *r* de Pearson representam a máxima correlação positiva; valores de -1 representam a máxima correlação negativa, ou inversa.

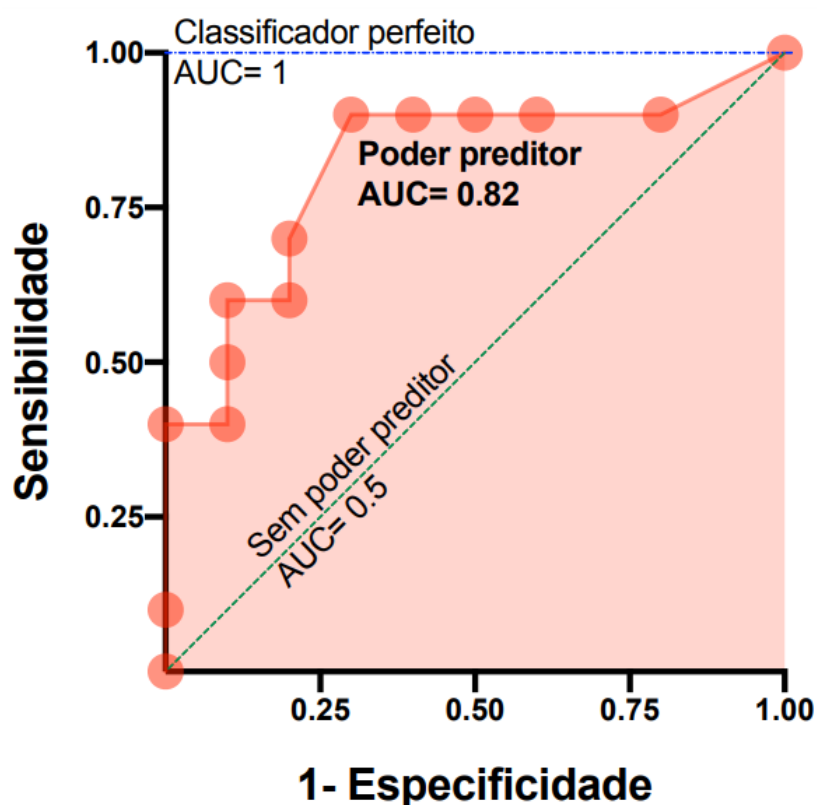
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Finalmente, a Figura 9 mostra a utilidade da concentração de neopterina como classificador da presença de ELA, através da curva operacional (ROC).



Pode ser observado que a ROC mostrou um valor preditivo significativo com uma área sob a curva de 82 % de sucesso em classificar participantes afetados com ELA de voluntários considerados controles (área  $0,81 \pm 0,10$ ; 95 % IC: 0,62 a 1,00;  $p < 0.05$ ). Esses valores foram calculados baseados na amostra corrigida sem a presença dos quatro *outliers*.

Figura 9 - Curva operacional (ROC) que permite prever a presença de esclerose lateral amiotrófica (ELA) nos participantes do estudo com uma área sob a curva (AUC) de 0,82. AUC= 0,82 indica uma capacidade classificatória de 82 % de prever a presença da condição ELA. AUC com valores de 0,5 não apresenta poder preditor, e com valores de 1 representa um classificador perfeito.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A área sob a curva apresenta uma métrica invariante em escala, uma vez que trabalha com precisão das classificações ao invés de seus valores absolutos. Além disso, também mede a qualidade das previsões do modelo, independentemente do limiar de classificação. Neste sentido, a composição da curva ROC foi baseada em *cut-off* que foram criados a partir de valores crescentes de 0,5 unidades de neopterin plasmática. A partir de cada *cut-off* a especificidade e sensibilidade foram calculadas e a curva ROC construída.

## 7 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar o papel do metabolismo da BH4 em fluídos biológicos de indivíduos acometidos por ELA com o intuito de identificar um biomarcador sensível e específico que possa determinar a presença precoce e/ou o grau de gravidade da ELA.

As doenças do neurônio motor incluem uma variedade de doenças adquiridas e condições neurodegenerativas hereditárias que lesionam predominantemente os neurônios motores. A ELA é a mais comum dessas doenças e foi o foco desta Dissertação de Mestrado.

O sistema de neurônios motores é composto por NMS e NMI. Os NMS residem no córtex motor primário do cérebro, e seus axônios compreendem o trato corticobulbar (ligando-se ao tronco cerebral) e o trato corticoespinal (conectando-se à medula espinhal). Os NMI, também chamados de neurônios motores alfa ou células do corno anterior, estão localizados nos núcleos no tronco cerebral ou na substância cinzenta anterior da medula espinhal.

Seus axônios conectam-se aos músculos da região bulbar ou membros. Uma lesão do neurônio motor resulta em perda da função muscular voluntária que pode afetar membros, o segmento bulbar, e/ou a função respiratória, com os sintomas específicos dependendo de qual parte da via motora é afetada (QUINN; ELMAN, 2020).

A ELA representa uma doença neurodegenerativa progressiva do sistema motor, envolvendo disfunção de NMS e NMI do sistema nervoso. Embora os sinais do NMS nem sempre são clinicamente aparentes, o envolvimento do NMI é mais perceptível através do exame clínico.

Na ELA ainda podem ser observadas anormalidades cognitivas, comportamentais e psiquiátricas (SHEFNER *et al.*, 2020). Acredita-se que, por ocasião do primeiro sintoma de ELA mais de 80 % dos neurônios motores já tenham sido perdidos (MITSUMOTO; RABKIN, 2007).

É importante frisar que o diagnóstico da ELA é evidente nos pacientes com longa evolução da doença, enquanto o diagnóstico precoce da doença, quando o paciente tem apenas sintomas focais em uma ou duas regiões pode ser difícil e dependerá da presença de sinais em outras regiões afetadas e de várias investigações seriadas (WILBOURN, 1998). Neste cenário, o diagnóstico de ELA é baseado primariamente em critérios clínicos e eletrofisiológicos, a partir

da presença de sinais de acometimento do NMI e NMS concomitantes em diferentes regiões do corpo (bulbar, membro superior, tronco ou membro inferior), envolvendo a realização de diversos exames complementares, incluindo ENMG, exames laboratoriais, ressonâncias de encéfalo e coluna cervical (CARVALHO *et al.*, 2008).

Em termos de tecnologias diagnósticas, evidências de suporte para disfunção do NMI tendem a ser derivadas de ENMG e ultrassonografia neuromuscular, especialmente a detecção de fasciculações em vários músculos.

As evidências de suporte para disfunção do NMS são mais limitadas, e são baseadas principalmente em estudos de ressonância magnética (QUINN; ELMAN, 2020). Ainda no campo do diagnóstico, podem ser realizados diversos exames laboratoriais para a exclusão de outras doenças, como hemograma completo, aminotransferases séricas, tempo de protrombina, PCR e CPK cujos resultados devem estar normais (ZAREI *et al.*, 2015).

Faz-se imprescindível, ainda no diagnóstico de ELA, realizar a exclusão de outras doenças que possam mimetizar a doença, como miopatias, miastenia gravis, diversas neuropatias, incluindo a neuropatia motora multifocal, neoplasias, mielopatias,iringomielia, paraparesias espásticas, esclerose múltipla, síndrome de Lambert – Eaton e deficiência de vitamina B12 (QUINN; ELMAN, 2020).

Com o objetivo de melhorar a precisão diagnóstica foram criados ao longo dos anos alguns consensos com o objetivo de melhorar o diagnóstico e definir critérios objetivos para o diagnóstico da ELA. Os primeiros critérios foram originalmente propostos por Lambert em 1957 e 1969, baseados nos achados da ENMG (WILBOURN, 1998). Depois foram criados os critérios de *El Escorial*, quando propuseram critérios eletrofisiológicos em 1994 mais característicos da ELA (BROOKS, 1994), sendo posteriormente revisado pelos critérios de Airlie House, ou *El Escorial* modificado (BROOKS *et al.*, 2000).

Os critérios de Awaji-Shima foram definidos em 2006 numa conferência em Awaji no Japão que acrescentou aos critérios anteriormente definidos, a presença de potenciais de fasciculações achados na eletromiografia como sendo representativos de denervação aguda, complementando os achados clínicos de denervação crônica. Recentemente, no intuito de melhorar o diagnóstico da ELA nas fases iniciais da doença, foram redigidos os critérios do consenso *Gold*

*Coast* (SHEFNER *et al.*, 2020), realizado na Austrália. Deste consenso, a ELA foi definida pela presença de:

- Comprometimento motor progressivo, documentado por história ou avaliação clínica repetida, precedido por função motora normal;
- Disfunção do neurônio motor superior e inferior em pelo menos uma região do corpo (na mesma região do corpo se apenas uma região do corpo estiver envolvida) ou disfunção do neurônio motor inferior em pelo menos duas regiões do corpo;
- Exclusão de processos patológicos alternativos.

Chama-se a atenção para o fato do diagnóstico da ELA ser difícil, tardio, oneroso e muitas vezes pouco conclusivo, devido a ausência de um marcador biológico e de características neurorradiológicas ou neurofisiológicas precisas, podendo atrasar o diagnóstico.

O diagnóstico da ELA é um diagnóstico de exclusão, principalmente por ser uma doença rara e complexa, e com uma ampla gama de diversidade de fenótipos.

Nos dias atuais não possuímos nenhum marcador quantitativo bioquímico que ajude na definição diagnóstica, ou que possa prever a presença da doença antes dos sintomas clássicos estarem instalados, quando de fato, é muito difícil intervir clínica ou farmacologicamente e reverter os processos neurodegenerativos já instalados. Desta forma é fundamental que se possa procurar alternativas diagnósticas que auxiliem na detecção precoce da ELA, como um biomarcador.

A maioria dos casos de ELA é do tipo esporádica (90 %) e expõe controvérsias em relação a possíveis fatores de risco. Evidências epidemiológicas sugerem que desportos profissionais com risco de concussão (como futebol) carregam o maior valor relativo risco de ELA em comparação com desportos profissionais sem risco de concussão e desportos não profissionais com e sem risco de concussão. Uma associação também existe entre militares, atletismo, exposição a certos solventes e pesticidas, tabagismo, exposição a metais pesados, cianotoxinas e choque elétrico (QUINN; ELMAN, 2020).

A história familiar é o único fator de risco estabelecido, já que a presença de mutações específicas permite realizar o diagnóstico genético em ELA familiar, o qual ocorre só em 10 % dos casos, e, na maioria das vezes, apresenta um padrão de herança autossômica dominante.

Apesar de haver uma casuística em torno de 10 % de casos de ELA familiar, os genes causadores da ELA foram identificados em cerca de 5 a 10 % de todos os casos ELA familiar (CHEN *et al.*, 2013).

Entre esses, os mais comuns são causados pela mutação no gene SOD1 (20 %), 4-5 % dos casos são resultados de mutações em genes TARDBP e FUS, mais de 30 % dos casos estão associados a mutações C9orf72 (CHEN *et al.*, 2013), e cerca de 17 % dos casos em estudo de triagem genética para a mutação C9orf72 na população brasileira, em estudo conduzido com dados dos anos de 1998 a 2016 (CINTRA *et al.*, 2018).

O principal limitante para poder contar com biomarcadores precoces da ELA reside principalmente no pouco entendimento da fisiopatologia. Embora nestas últimas décadas tenha-se produzido uma grande evolução sobre o entendimento dos diferentes aspectos da doença, ainda não existe definição clara sobre os mecanismos moleculares envolvidos. Inclusive, ainda são empregados instrumentos diagnósticos que vêm sendo modificados ao longo dos anos, desde o momento da criação originalmente proposto por Lambert em 1957, passando pelos critérios de *El Escorial* e *Awaji-Shima*, até os recentemente publicados critérios de *Gold Coast* (SHEFNER *et al.*, 2020).

A FDA (do Inglês, *Food and Drug Administration*) define a um biomarcador como uma característica determinada que é medida como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas a uma exposição ou intervenção, incluindo intervenções terapêuticas (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2021). Por exemplo, características moleculares, histológicas, radiográficas ou fisiológicas são tipos de biomarcadores (WILKINS; DIMACHKIE; AGBAS, 2021).

Um biomarcador não necessariamente forma parte da fisiopatologia da doença; o marcador biológico só informa sobre um determinado processo. Mas, conhecendo melhor os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de processos neurodegenerativos, se abre a oportunidade de identificar potenciais metabolismos celulares que possam informar também sobre a condição do processo num determinado indivíduo.

Assim, contar com um biomarcador que permita identificar a presença, ou a detecção pré-sintomática da disfunção dos neurônios motores, que são os corpos celulares afetados inicialmente na ELA (MEJZINI *et al.*, 2019), se transformaria numa ferramenta de uso na clínica muito valiosa.

Os biomarcadores ainda devem possuir determinadas características incluindo serem precisos, sensíveis, acessíveis, e principalmente identificar indivíduos portadores da doença e indivíduos saudáveis (BENATAR *et al.*, 2016). Isso significa, que ainda deve existir uma equipe treinada que tenha a capacidade de desenvolver métodos quantitativos que permita mensurar o biomarcador.

Tipicamente, as doenças neurodegenerativas, como a ELA, têm utilizado nos últimos anos alguns biomarcadores que incluem:

- *Mensurações genéticas*: principalmente mutações associadas ao gene SOD1, que estão associadas à forma familiar da ELA (MEJZINI *et al.*, 2019), ou genes associados a maior risco de desenvolver a forma esporádica da ELA, como *C9orf72*, TDP-43, FUS e SOD1 (CHEN *et al.*, 2013);
- *Bioquímicos*: marcadores inflamatórios como a PCR (MCGEER; MCGEER, 2002);
- *Imagens funcionais* como a tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (*PET scan*) (BENATAR *et al.*, 2016) e
- *Análises estruturais* como os biomarcadores em neuroimagem na ressonância magnética tais como morfometria baseada em Voxel, e em superfície, e imagem do tensor de difusão (BENATAR *et al.*, 2016).

No entanto, nenhum destes biomarcadores, com exceção daqueles que permitem o diagnóstico genético, conseguiram identificar *a priori* portadores de ELA até o início dos sintomas acontecerem. Portanto, o intuito deste trabalho foi buscar novos marcadores, que evidenciem a atividade de determinadas vias metabólicas que potencialmente indiquem a presença da ELA.

O aumento crescente na incidência de diagnósticos de indivíduos acometidos por doenças neurodegenerativas no mundo, acompanhando o envelhecimento populacional, em particular a ELA, a necessidade de encontrar alternativas terapêuticas mais efetivas para as mesmas, e a necessidade de contar com biomarcadores quantitativos que permitam prognosticar o curso da doença, justificaram o desenvolvimento deste trabalho que visou entender o papel do metabolismo da BH4 no processo neurodegenerativo da ELA e que baixas concentrações de BH4 possam ser identificadas precocemente em pacientes acometidos por ELA, antes dos sintomas clínicos clássicos estarem instalados.

A BH4 é a forma reduzida e funcional da pterina denominada biopterina, atuando como cofator obrigatório para a atividade das enzimas fenilalanina hidroxilase, tirosina hidroxilase e triptofano hidroxilase, as quais catalisam as etapas iniciais da degradação da fenilalanina no fígado, assim como as etapas limitantes da biossíntese dos neurotransmissores dopamina e serotonina (GHISONI *et al.*, 2015a; PIRES *et al.*, 2020b).

Além disso, a BH4 também atua como cofator obrigatório para a atividade de todas as isoformas de óxido nítrico sintase, sendo, portanto, essencial para a síntese de óxido nítrico, molécula mensageira envolvida em no sistema vascular e nos processos cognitivos, entre outros (TAYEH; MARLETTA, 1989). A BH4 é ainda um cofator obrigatório para o metabolismo de éteres lipídicos, por ser o cofator da enzima alquilglicerol monooxigenase (AGMO) (SAILER *et al.*, 2021).

A síntese de BH4 está presente em provavelmente todas as células e tecidos dos organismos superiores (KAUFMAN, 1993) (MARTINS *et al.*, 2018) e é esperado que sua disfunção ou deficiência comprometa numerosos processos celulares que podem promover o aparecimento ou a progressão do curso da doença de doenças neurodegenerativas, incluindo a ELA.

A neopterinina, um dos metabólitos da BH4, é um subproduto da via *de novo* da BH4 (ver Figura 1) e tem sido empregada por mais de cinco décadas como um marcador sensível da ativação do sistema imune, tanto em condições inflamatórias agudas como crônicas (BAIER-BITTERLICH *et al.*, 1995; CIRILLO *et al.*, 2006; HOFFMANN *et al.*, 1996; SCHOBERSBERGER *et al.*, 1996; WEISS *et al.*, 1993).

A neopterinina é formada em grandes quantidades e liberada no sangue por células imunes antes das citocinas pró-inflamatórias clássicas como IL-1 $\beta$  e IL-6 aparecerem no plasma de indivíduos acometidos por doenças inflamatórias crônicas e agudas (HULL; PASINETTI; AISEN, 2000; WESTARP *et al.*, 1994; WIDNER; LEBLHUBER; FUCHS, 2002; WISSMANN *et al.*, 2013).

A diferença temporal se deve à via *de novo* da BH4 ser controlada transcricionalmente por mediadores pró-inflamatórios como o IFN- $\gamma$ , e por peróxido de hidrogênio (FRANSCINI *et al.*, 2003), um mediador de estresse oxidativo e de disfunção mitocondrial (ISHII *et al.*, 2005). Neste contexto, nosso grupo demonstrou pela primeira vez que a neopterinina é também liberada por células nervosas humanas primárias, incluindo neurônios glutamatérgicos,

astrócitos e microglia quando expostas a um ambiente inflamatório (MARTINS *et al.*, 2018).

Demonstramos também que a exposição de células nervosas humanas a lipopolissacarídeo ou interferon- $\gamma$  provocou a formação de uma taxa constante de neopterina, sugerindo que a secreção de neopterina, e portanto, do metabólito principal da via, a BH<sub>4</sub>, é um processo constitutivo e que potencialmente ocorre por difusão passiva seguindo um gradiente de concentração de forma não saturável (MARTINS *et al.*, 2018).

Estudos prévios têm demonstrado que os níveis de neopterina se encontram aumentados no plasma de indivíduos afetados por outras doenças neurodegenerativas, incluindo as doenças de Parkinson (WIDNER; LEBLHUBER; FUCHS, 2002), de Alzheimer e de Huntington (LEBLHUBER *et al.*, 1998), e que esse aumento é independente das concentrações cerebrais (KUEHNE *et al.*, 2013).

No caso particular da ELA, a literatura tem apresentado resultados contraditórios relacionados com as concentrações de neopterina em diferentes fluidos biológicos. Por exemplo, as concentrações plasmáticas de neopterina foram reportadas como normais em três estudos que envolveram 62 (WESTARP *et al.*, 1994), 38 (WESTARP *et al.*, 1993b), e 47 (WESTARP *et al.*, 1993a) casos de ELA esporádica.

Estes trabalhos provenientes do mesmo grupo de pesquisa, estariam em princípio de acordo com os resultados apresentados nesta dissertação; no entanto, existem alguns pontos que devem ser ressaltados. Dois dos trabalhos acima citados usaram uma população histórica como grupo controle, escolhidos de um banco de dados de indivíduos que realizaram *check up* clínico-bioquímico e que supostamente não estariam afetados por nenhum tipo de condição que poderiam modular os níveis de neopterina.

Esses indivíduos geraram um limite de corte de neopterina plasmática de 10 nmol/L, bem maior dos valores conhecidos como normais para indivíduos saudáveis de 5 nmol/L (ESPÍNDOLA; SCHEFFER; LATINI, 2021; MATIOLLO *et al.*, 2020). Os autores ainda ressaltaram que, apesar dos valores terem sido encontrados dentro da normalidade, observaram um aumento linear nos valores plasmáticos de neopterina com o aumento da idade (WESTARP *et al.*, 1994). Ainda, esses estudos utilizaram como grupo controle indivíduos que não foram



pareados por sexo e idade, o que pode ter comprometido a análise do intervalo de normalidade relatada.

No terceiro trabalho acima citado, o grupo controle foi constituído por 195 pacientes neurológicos internados sem afecção aguda de nervos cranianos, mielopatia ou síndromes parkinsonianas (WESTARP *et al.*, 1993b). Embora os controles não fossem afetados por ELA, ou outra doença neurodegenerativa, apresentavam alguma disfunção neurológica, colocando um viés ao grupo controle. Como esses controles se encontravam internados por causa da disfunção neurológica, estes participantes poderiam ter vários fatores modulando o metabolismo do BH4.

De acordo com a Figura 7A observamos que a maioria dos participantes acometidos por ELA apresentaram valores menores ou similares ao grupo controle, e só quatro deles se encontram aumentados. Quando estes *outliers* foram excluídos, os grupos diferenciaram-se significativamente. Ainda, houve um participante com ELA familiar, que apresentou valores similares ao resto do grupo de participantes com ELA esporádica.

O grupo controle desta pesquisa foi estrategicamente definido por voluntários saudáveis que apresentaram IMC menor que 25, não relataram queixa de dor crônica, não apresentaram história prévia de doenças neuropsiquiátricas, de condições crônicas inflamatórias ou autoimunes, não apresentaram história de internação, de cirurgia, de doenças infectocontagiosas, ou de uso de anti-inflamatórios e antibióticos por mais de três dias nos últimos três meses; sem gestação ou puerpério nos últimos seis meses, e sem história de neoplasia nos últimos doze meses. Este grupo controle apresentou valores de neopterina plasmática de  $2,29 \pm 6,10$  que se encontram de acordo com a literatura (ESPÍNDOLA; SCHEFFER; LATINI, 2021; MATIOLLO *et al.*, 2020). Dessa forma, sabendo que a neopterina se encontrou diminuída significativamente em 89 % dos participantes com ELA permite sugerir que *i)* a síntese de BH4 se encontra diminuída o que provoca menores valores de neopterina, ou que *ii)* a BH4 e/ou neopterina estão sendo consumidas por processos oxidativos, por processos que metabolizam lipídeos, ou por produção excessiva de óxido nítrico. Em ambos os casos, as concentrações em defeito do cofator enzimático poderiam comprometer o sistema de neurotransmissão e vascular central, e gerar o acúmulo de lipídeos atípicos tóxicos, propiciando um ambiente neurodegenerativo.

Nosso grupo de pesquisa tem descrito que além da função tradicionalmente descrita de cofator enzimático, a BH4 e também a neopterinina são moléculas antioxidantes ((MARTINS *et al.*, 2018; GHISONI *et al.*, 2015b; LATINI *et al.*, 2019), reguladores da resposta inflamatória (CRONIN *et al.*, 2018), e potencializadores da geração de energia (LATINI *et al.*, 2018), funções que foram demonstradas em sistemas experimentais e em amostras humanas.

Existem também descrições na literatura quanto aos valores de neopterinina na ELA no LCR. Os artigos acima citados do grupo de Westarp e colaboradores (WESTARP *et al.*, 1993a, 1993b, 1994) reportaram as concentrações de neopterinina no LCR como normais nos casos de ELA, mas, como discutido anteriormente, não houve comparação com um grupo controle de voluntários saudáveis. De forma similar aos estudos de Westarp *et al.* (1993a; 1993b; 1994), um estudo realizado em 34 participantes afetados por diferentes doenças neurológicas/neurodegenerativas, incluindo os 12 participantes afetados por ELA (YOSHIDA *et al.*, 1999) mostrou valores de neopterinina de  $16,0 \pm 5,3$  nmol/L em sujeitos controles e de  $23,7 \pm 10,2$  nmol/L nos participantes afetados com ELA.

Novamente o grupo controle considerado como sadio foi obtido de pacientes sem doenças neurológicas, mas com fratura óssea de perna, o que pode ter modulado o metabolismo central da BH4, não permitindo evidenciar as concentrações aumentadas no LCR do grupo com ELA. Os autores deste trabalho também sugeriram que a produção de neopterinina corresponde à produção central da molécula, e não se trata de uma mera difusão desde o plasma (YOSHIDA *et al.*, 1999). Esta conclusão está de acordo com Keune e colaboradores (KUEHNE *et al.*, 2013) que demonstraram aumento das concentrações de neopterinina exclusivamente no LCR de indivíduos afetados por esquizofrenia e doenças do espectro afetivo sem apresentar compromisso na permeabilidade da barreira hemato-encefálica (KUEHNE *et al.*, 2013). Também está de acordo com o nosso trabalho pioneiro demonstrando que existe síntese de neopterinina por células nervosas humanas quando submetidas a um ambiente inflamatório (MARTINS *et al.*, 2018).

Ainda, sabe-se que a passagem de neopterinina desde o plasma para o LCR teria que seguir um gradiente de 40:1 (HAGBERG *et al.*, 2010), indicando que aumentos no LCR devido a um aumento nas concentrações plasmáticas deveriam envolver aumentos de pelo menos 40 vezes no plasma para aparecer

no LCR, como tem sido descrito em indivíduos afetados por o vírus da imunodeficiência humana (BAIER-BITTERLICH; WACHTER; FUCHS, 1996; HAGBERG *et al.*, 2010).

Apesar da avaliação de neopterinina no LCR não ter sido objeto de nossa pesquisa, percebe-se a importância da aplicabilidade clínica da determinação de neopterinina como indicador prognóstico ou de acompanhamento evolutivo nestes indivíduos com ELA, principalmente por refletir a atividade do metabolismo da BH4 no sistema nervoso central.

Recentemente, um grupo de pesquisadores avaliou as concentrações de neopterinina na urina de 81 participantes acometidos por ELA e 68 indivíduos saudáveis pareados por sexo e idade (LUNETTA *et al.*, 2020). Os autores demonstraram um aumento significativo da neopterinina na urina, e sugeriram que esse aumento reflete o processo neurodegenerativo. Neste sentido, o nosso grupo de pesquisa se posicionou frente a estas conclusões mediante uma carta ao editor (ESPÍNDOLA; SCHEFFER; LATINI, 2021), justificando que provavelmente a neopterinina urinária esteja relacionada ao grau inflamatório sistêmico e ativação de células imunes circulantes no sangue, e que não necessariamente representa a gravidade do processo neurodegenerativo, como discutido acima. Além disto, os pacientes encontravam-se em estágios mais avançados da doença, fato que pode ter determinado os níveis aparentemente mais altos de neopterinina sistêmica, pelo avanço do processo inflamatório.

Um estudo longitudinal que avaliou as concentrações urinárias de neopterinina em 29 participantes com ELA (SHEPHEARD *et al.*, 2021), encontrou resultados similares aqueles publicados por Lunetta e colaboradores (LUNETTA *et al.*, 2020).

Os autores mostraram aumento longitudinal dos níveis de neopterinina e sugeriram que a medida poderia se transformar num biomarcador da progressão da ELA (SHEPHEARD *et al.*, 2021). No entanto, novamente ressaltamos que baseado na baixa difusão de neopterinina plasmática para o sistema nervoso central (HAGBERG *et al.*, 1993), e a falta de informação sobre a permeabilidade da barreira hemato-encefálica dos participantes dos estudos de Lunetta (LUNETTA *et al.*, 2020) e Shephard (SHEPHEARD *et al.*, 2021), é impossível prever uma origem diferente para a neopterinina urinária que não seja a plasmática, o que provavelmente reflete a ativação de células imunes

sanguíneas, as principais produtoras de neopterinina periféricamente (WERNER-FELMAYER *et al.*, 1990).

A análise da curva ROC foi incluída para avaliar o poder preditor de baixas concentrações de neopterinina na classificação de participantes afetados por ELA. Com os resultados tendendo ao valor 1 de predição perfeita, foi demonstrado que há 82 % (AUC= 0,82) de probabilidade de valores baixos de neopterinina serem encontrados em participantes com ELA. Assim, podemos propor a neopterinina plasmática como um potencial biomarcador no ELA.

No caso do nosso estudo, podemos sugerir que as baixas concentrações de neopterinina observadas no plasma dos participantes afetados por ELA podem representar aumento do estado oxidativo. Essa conclusão está baseada em observações pré-clínicas do nosso grupo demonstrando potente capacidade antioxidante (LUCAS *et al.*, 2014; GHISONI *et al.*, 2015b). Assim, este trabalho também abre uma nova linha de pesquisa que visará analisar o estado oxidante nos participantes deste estudo.

Com o propósito de contribuir com a definição da casuística de ELA no estado de Santa Catarina, foram aplicados questionários, instituído escalas e realizado exames laboratoriais e avaliação das principais mutações gênicas em ELA.

Por se tratar de uma doença rara, de evolução rápida e prognóstico desfavorável, é desafiador realizar estudos epidemiológicos em larga escala em ELA. Exemplo desse desafio é o estado de Santa Catarina pois somos um estado da região sul da federação brasileira com uma população estimada de 7.338.473 pessoas distribuídas em 295 municípios e 6 mesorregiões, com raras discussões sobre essa doença.

Não há dados precisos da incidência global e prevalência de ELA em Santa Catarina devido a falta de estudos neste tema. Efetivamente, não possuímos uma definição de dados epidemiológicos estaduais nem se há diferenças regionais relacionadas a fatores socioeconômicos, genéticos ou ambientais.

Considerando a importância de aprofundar os estudos sobre a ELA em todos os estados brasileiros, nos propusemos a realizar a primeira série de casos de ELA em Santa Catarina, fornecendo a pioneira descrição epidemiológica acerca desta doença. Entretanto, devido a localização geográfica do HUPEST,

localizado em Florianópolis, em uma ilha na porção mais a leste do estado, alguns participantes que residem perto do hospital estiveram mais representados em nossa amostra.

A primeira constatação do nosso estudo foi a idade média do início dos sintomas da ELA de 56,8 anos, semelhante a outros estudos, como nos estados de Minas Gerais (PRADO *et al.*, 2016), Paraná (TRILICO *et al.*, 2020) bem como no Brasil (COUTO *et al.*, 2021). Neste, foi avaliado, retrospectivamente, a quantidade de 1.116 indivíduos com ELA coletados de 308 cidades de 25 estados brasileiros.

Todavia, em comparação a estudos internacionais (MARIN *et al.*, 2016), o início de sintomas foi mais precoce em nossa pesquisa. Esta diferença possivelmente pode estar relacionada a menor expectativa de vida no Brasil em relação aos países desenvolvidos, bem como características econômicas, ambientais e genéticas que possam alterar o início da doença.

Como outro ponto de destaque em nosso estudo, a proporção de sexo masculino/feminino encontrada foi semelhante aos da literatura nacional (PRADO *et al.*, 2016; LINDEN-JUNIOR *et al.*, 2013; COUTO *et al.*, 2021) e internacional, os quais mostram uma relação variando de 1,2 – 1,7:1 (MARIN *et al.*, 2016).

Quanto ao nível educacional médio encontrado em nossos participantes foi maior que a média da população catarinense de 9,7 (IBGE, 2019) e que a média nacional de 9,4, caracterizando a diversidade e disparidade das distribuições regionais e sociais pelo país e refletindo um melhor nível educacional encontrado na região sul do Brasil.

A apresentação clínica da ELA é heterogênea e carrega estreita ligação com o tipo de NM predominante afetado e o fenótipo clínico (TAKEDA; KITAGAWA; ARAI, 2020).

A maioria dos pacientes no Brasil e no mundo tem como fenótipo clínico de ELA de início espinhal (BROWN; AL-CHALABI, 2017; COUTO *et al.*, 2021; TAKEDA; KITAGAWA; ARAI, 2020), concordante com o resultado da nossa pesquisa, inferindo que, embora seja uma amostra pequena, podemos confirmar que a nossa população estudada não se diferencia do restante do Brasil, e que a apresentação clínica de Santa Catarina é muito similar a encontrada no país.

Nesse aspecto temporal do estudo, encontramos uma mediana de 12 meses em relação ao tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico. Este

intervalo foi mais prolongado para indivíduos com ELA de início espinal em comparação com indivíduos com ELA de início bulbar. Este intervalo de tempo até o diagnóstico tem sido muito explorado em estudos clínicos relacionados a ELA e há uma concordância geral de que os casos de ELA de início bulbar, comparados ao de início espinal, têm menor tempo até o diagnóstico.

Ainda neste tema, em relação à média geral de tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico, nossos resultados encontrados são discrepantes da literatura. Um estudo em países desenvolvidos (MARIN *et al.*, 2016) encontrou dados comparáveis aos apresentados no presente estudo, mostrando um intervalo de 10 a 17 meses, já em uma outra pesquisa envolvendo uma base populacional italiana, com 130 casos de ELA, mostrou um tempo mais curto até o diagnóstico com 9,3 meses (ZOCCOLELLA *et al.*, 2006). Por fim, os dados em uma pesquisa da população mineira (PRADO *et al.*, 2016) de uma série de casos de 72 participantes com ELA e outra nacional (COUTO *et al.*, 2021) que avaliou 1116 indivíduos com ELA encontrou valores maiores que os resultados da nossa pesquisa, com médias de 20 e 17,6 meses, respectivamente.

Dessa forma, podemos concluir que esta discrepância possa ter relação com o índice de desenvolvimento do país, à medida que a disponibilização de mais recursos e acesso rápido ao médico especialista e a exames complementares contribui para um diagnóstico mais precoce dos pacientes.

Como quesito avaliado, o tempo de evolução do diagnóstico até o dia da entrevista, nossos dados mostraram-se maiores, e por conseguinte, discordantes do mais recente estudo nacional (COUTO *et al.*, 2021). Isto pode ter ocorrido devido ao fato de nossa amostra ter sido composta por 11 participantes com mais de 7 anos de evolução de doença, tempo incomum de sobrevivência para portadores de ELA. Com base nestes dados, inferiu-se que este perfil de participantes teve maior representatividade na participação do estudo devido ao fato que, quanto mais lenta for a evolução clínica, maior a chance de permanecer em condições clínicas de deslocamento e com isto, maiores as chances de participar do estudo.

De forma inversa, aqueles participantes que neste estudo apresentaram a forma clínica de ELA mais severa e evolução mais rápida, apresentaram menor representatividade por não possuírem condições de integrar o estudo.

Para aprofundar esta análise, destaca-se, ainda, nos dados encontrados, ter ocorrido uma relação direta entre o tempo entre o início dos

sintomas até o diagnóstico, com o tempo de duração da doença, até a entrevista e o tempo que o participante permanecia apresentando sintomas de câimbras.

Estes achados corroboram com o estudo italiano com 130 indivíduos diagnosticado com ELA (ZOCIOLELLA *et al.*, 2006), ao afirmar que habitualmente, a fase caracterizada pela presença apenas de câimbras é geralmente muito curta pois outros sintomas sobrevêm as câimbras. Naqueles pacientes com câimbras, sem fraqueza ou atrofia, são mais propensos a ter um curso mais lento e com disseminação limitada de sinais e sintomas em diferentes regiões do corpo, sendo mais difícil preencher os critérios para realizar o diagnóstico.

Com os resultados de nosso estudo, os sintomas clínicos iniciais relatados foram fraqueza em membros superiores, seguido de fraqueza em membros inferiores e disartria. Estes dados foram semelhantes ao encontrado em um estudo realizado no estado de Minas Gerais (PRADO *et al.*, 2016), ao analisar uma série de casos de 72 indivíduos que eram acompanhados em dois diferentes hospitais públicos daquele estado, mostrando que, mesmo em regiões distintas do Brasil, não se observa distinção entre as características clínicas iniciais da ELA.

A dificuldade em preencher os critérios para o diagnóstico de ELA e a progressão rápida dos sintomas são os principais fatores complicadores no acompanhamento destes sujeitos.

O diagnóstico precoce e a melhora da qualidade de vida podem contribuir para a melhora do desfecho clínico, especialmente naqueles mais afetados e com pior prognóstico.

No tópico de avaliação de possíveis preditores de maior tempo entre o início dos sintomas até o diagnóstico, encontramos o fenótipo de ELA de início espinal, corroborando com (ZOCIOLELLA *et al.*, 2006). Estes achados podem ser consequência de um diagnóstico diferencial mais difícil com outras doenças como mielopatias secundárias e a espondilose vertebrais.

Também foi observado como preditor do maior tempo entre o início dos sintomas até o diagnóstico os participantes com idade mais jovem ao início dos sintomas, diferentemente dos dados encontrados em Zoccolella e colaboradores, que perceberam um maior tempo até o diagnóstico nos indivíduos idosos, com idades entre 65 e 75 anos (ZOCIOLELLA *et al.*, 2006).

Desta maneira, nossos achados precisam de replicação em mais estudos para confirmação dos resultados.

Explorando mais acerca de predição, pudemos observar em nosso trabalho que os preditores de qualidade de vida estão relacionados a funcionalidade, representada pela escala ALSFRS-R/BR. Estes dados foram confirmados por literatura que abordou metodologia semelhante de pesquisa (ALENCAR *et al.*, 2021) com 45 indivíduos com ELA acerca de qualidade de vida, funcionalidade e fadiga.

Os autores alertam para a necessidade de disponibilizar condições e aumentar a atenção no acompanhamento de pacientes com estas características, a fim de minimizar possíveis prejuízos na qualidade de vida durante a evolução da doença.

Em se tratando da avaliação da CVF, foram observados valores menores em participantes do sexo feminino, diferentemente de outros estudos na qual foi realizada uma revisão prospectiva de sujeitos em uso de ventilação mecânica invasiva e não invasiva, não tendo observado diferenças do CVF em relação ao sexo (PINTO; PINTO; CARVALHO, 2007; TOLLEFSEN *et al.*, 2010). Neste sentido, nossos dados podem ter sido reflexo da pequena amostra das espirometrias analisadas, já que cerca de metade dos participantes trouxeram o exame, realizado previamente, no dia da entrevista, e não houve realização deste exame na mesma data, contribuindo para que os resultados não reflitam a situação atual do participante. Desta forma, é necessário realizar mais estudos no futuro para avaliar a replicabilidade dos dados.

Muitos estudos têm avaliado a função respiratória em indivíduos com ELA, considerando a relevância dos sintomas na qualidade de vida e prognóstico destes indivíduos. Independente dos diferentes tipos de apresentação clínica, a grande maioria dos indivíduos acaba apresentando dificuldades com fala, obstrução das vias aéreas ou aspiração pulmonar de secreções à medida que a fraqueza de músculos respiratórios e de segmento bulbar progridem. Pode haver também alteração na função do nervo frênico, resultando em fraqueza do diafragma e ocasionando dispneia, ortopneia e hipoventilação e por conseguinte, podem gerar sintomas como sonolência diurna excessiva (HARDIMAN; VAN DEN BERG; KIERNAN, 2011).

As intervenções não farmacológicas, como a ventilação não invasiva, tornaram-se o padrão de cuidados para suporte respiratório em pacientes com



ELA ao demonstrar benefícios em melhorar a qualidade de vida e a sobrevida, à medida que apresentam declínio mais lento da fraqueza respiratória em comparação aos pacientes não tratados.

O *BiPAP* é um dos tipos de respiradores mecânicos usados no suporte ventilatório por pressão e que são tipicamente empregados para a ventilação não invasiva, tendo a capacidade de gerar um fluxo de ar para o paciente fazendo com que a pressão nas vias aéreas do indivíduo fique sempre positiva. As indicações ao uso do *BiPAP* estão relacionadas aos diversos parâmetros como  $CVF < 50\%$ , pressão inspiratória máxima inferior a 60 cm H<sub>2</sub>O, dessaturação noturna  $< 89\%$  por  $> 5$  minutos ou Pressão parcial do gás carbônico ( $PCO_2$ )  $> 45$  mm Hg. Quando há necessidade do uso de *BiPAP* por um período maior do dia, este deve ser trocado por um ventilador não invasivo (BOURKE *et al.*, 2006).

Ao tratar deste tema e sua relação entre a presença de sonolência diurna excessiva e os sintomas ventilatórios, foram encontrados valores médios normais na escala de sonolência diurna de *Epworth* e de *CVF*. Todavia, através do interrogatório de sintomas relacionados a ventilação, foram observados uma percentagem maior de relatos com sintomas de fadiga e dispneia em esforço comparado a uma menor percentagem de participantes que utilizavam o dispositivo *BiPAP*. Isto pode denotar que a escala de *Epworth* não contribua como um instrumento específico e precoce para este grupo de participantes.

Da mesma maneira, os valores absolutos de *CVF* possam apresentar esta mesma limitação tendo em vista principalmente os indivíduos com predomínio da forma bulbar, que pode não haver vedação labial suficiente para realizar a espirometria, ocasionando limitações na medição do *CVF* e subestimando o grau de disfunção muscular respiratória.

Outro fator observado foi o baixo percentual da utilização de *BiPAP* em relação a porcentagem de sintomas ventilatórios relatados pelos participantes. Isto pode ser o resultado de uma demora na indicação clínica para a utilização deste tipo de dispositivos.

Como a utilização de ventilação não invasiva prolonga a sobrevida e melhora a qualidade de vida dos indivíduos afetados por ELA (HOBSON; MCDERMOTT, 2016), é de suma importância questionar ativamente acerca dos sintomas relacionados a ventilação bem como instituir precocemente a indicação de dispositivos específicos, evitando piora do desfecho e prognóstico clínico.

A população do estudo foi composta na maioria dos casos por indivíduos com diagnóstico de ELA clinicamente definida, a partir dos critérios de Awaji-Shima, e pelo fenótipo clínico de início espinal, bem como a categoria clínica inicial, que foi de ELA do tipo espinal, sendo mais prevalente a do subtipo lombar, dados semelhantes a literatura (VELDINK *et al.*, 2014; ZOCCOLELLA *et al.*, 2006).

Houve, a partir de nossos resultados, maior comprometimento na forma leve da escala de estado de saúde em mulheres e moderada em homens, que estão de acordo com estudo anterior (SHAMSHIRI *et al.*, 2016) mas discordante do estudo de Gomes e colaboradores (GOMES *et al.*, 2021) que teve em sua amostra uma maior percentagem de indivíduos nas formas severa e terminal, fato este que pode estar diretamente relacionada a população estudada neste grupo, já que o intervalo de tempo do início dos sintomas até o diagnóstico foi maior que o dobro do tempo encontrado em nossa pesquisa, possivelmente contribuídos por uma assistência à saúde mais tardia e menor precocidade de intervenção, prejudicando o desfecho observado. Além disto, obtivemos a particularidade de encontrar uma população de homens mais jovens estarem no estágio terminal, apesar da amostra deste estágio ter sido pequena.

Desta forma, os resultados sobre a classificação da ELA pelos critérios de Awaji-Shima, fenótipo clínico e escala de saúde estão de acordo com estudos anteriores e ratificam várias características clínicas comuns a indivíduos portadores de ELA.

A amostra foi composta, predominantemente, por ELA do tipo esporádica, sendo constatado apenas um participante confirmando a forma de ELA do tipo familiar devido a mutação do gene *FUS*. Apesar deste gene seja responsável por uma pequena porcentagem de casos familiares e da forma esporádica, indivíduos com esta mutação são caracterizados por uma ampla gama de início da doença de 26 a 80 anos com a duração média em torno de 33 meses. A maioria dos casos mostra predominância de sinais de NMI, sem envolvimento da região bulbar e sem comprometimento cognitivo. Estas mutações também são encontradas em indivíduos acometidos por ELA e DFT e em pacientes juvenis de ELA (CHEN *et al.*, 2013).

Embora tenha havido relato de 5 casos familiares de ELA nos participantes do estudo, a casuística encontrada com a relação entre apresentar casos familiares de ELA e ser detectado algum tipo de mutação gênica

relacionada a ELA foi mais baixa que uma coorte recém-publicada no país (GONÇALVES *et al.*, 2021), pois foi encontrada apenas um participante com mutação no gene *FUS*, e nesta coorte foi identificada a mutação genética em 70% das famílias estudadas.

Outrossim, é importante enfatizar que o painel de mutações genéticas realizado em nossa pesquisa não avaliou a presença da mutação no gene *C9orf72*, o segundo gene mais prevalente entre indivíduos com ELA do tipo familiar e esporádica Brasil (GONÇALVES *et al.*, 2021).

O uso dos instrumentos de avaliação funcional permite classificar e avaliar a progressão da doença relativa à funcionalidade, além de tornar a avaliação quantitativa de fácil aplicação, interpretação e comparação.

A Escala ALSFRS/R-BR é um instrumento de avaliação funcional de baixo custo e fácil aplicação, podendo ser utilizado como um preditor da progressão de doença ao avaliar as limitações diárias, além de não necessitar de equipamentos de medição ou treinamento intensivo, auxiliando profissionais da área da saúde, tanto para a prática clínica quanto em estudos científicos envolvendo indivíduos com ELA (GUEDES *et al.*, 2010).

A qualidade de vida está relacionada com a percepção que o indivíduo tem de si mesmo dentro do seu contexto de vida, incluindo objetivos, expectativas e preocupações.

O interesse em mensurar e monitorar o estado de saúde e perspectiva de pacientes com diagnósticos que levam as condições neurológicas, como a ELA, que apresenta consequências consideráveis para o indivíduo, cresceram durante nos últimos anos.

A escala de ALSAQ-40/BR foi desenvolvida especificamente para ser usada em pacientes com ELA e tem se mostrado um instrumento válido para a avaliação da qualidade de vida entre os pacientes (GREEN *et al.*, 2003) foi traduzida e validada para uso no Brasil em 2010 (PAVAN *et al.*, 2010).

A respeito deste tema, os primeiros valores avaliados em nosso estudo foram os escores totais da escala ALSFRS-R/BR que foram compatíveis com a literatura (VELDINK *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2021; ALENCAR *et al.*, 2021).

Já para os escores totais de ALSAQ-40/BR dos participantes de nossa pesquisa, encontrou-se dados antagônicos no comparativo com outros estudos, mostrando artigos com resultados semelhantes (GOMES *et al.*, 2021) e valores superiores ao nosso estudo (ALENCAR *et al.*, 2021), com metodologia

semelhante a nossa. Um terceiro estudo (VELDINK *et al.*, 2014) randomizado, controlado e multicêntrico demonstrou valores médios menores na escala de qualidade de vida que o encontrado por nossa equipe.

Estas diferenças sugerem que são necessárias pesquisas adicionais para entender melhor quais fatores externos, ambientais e genéticos possam influenciar na qualidade de vida, à medida que com a mesma funcionalidade, a qualidade de vida possa flutuar, e desta forma, interferir positivamente para melhorar este desfecho.

Na análise da mensuração da capacidade funcional e qualidade de vida de indivíduos com diagnóstico de ELA em nosso estudo, foram correlacionadas as escalas de ALSFRS-R/BR e a CVF com fenótipo clínico separados por sexo e não foram encontradas diferenças em nenhuma das comparações.

A relação da ALSFRS-R/BR com sexo e fenótipo clínico também foi estudada por Alencar e colabores (ALENCAR *et al.*, 2021), que corrobora com nossos dados, bem como os achados observados em relação ao CVF (PINTO; PINTO; CARVALHO, 2007).

Por outro lado, a escala de ALSAQ-40/BR encontrou pior índice de qualidade de vida no fenótipo bulbar, sendo ainda mais proeminente no sexo feminino, estando de acordo com estudo brasileiro que enfatizou a piora da escala ALSAQ-40/BR no sexo feminino, mas não avaliou a relação da escala com o fenótipo clínico (ALENCAR *et al.*, 2021).

Dada a importância das escalas de funcionalidade e qualidade de vida, foram realizadas correlações entre estas e constatamos que as escalas ALSFRS-R/BR e ALSAQ-40/BR expuseram uma correlação negativa. Isto decorre em virtude da contagem de pontuação ser considerada invertida na ALSAQ-40/BR, visto que uma maior pontuação neste escore denota pior qualidade de vida.

Posto isto, os dados denotam que um maior escore na ALSFRS-R/BR significa uma menor dificuldade nas AVD e, por conseguinte, melhor qualidade de vida na escala de ALSAQ-40/BR, concordante com a literatura (ALENCAR *et al.*, 2021; GOMES *et al.*, 2021), que realizou estudo prospectivo de indivíduos com ELA e avaliou ambas as escalas.

A correlação dos resultados do nosso estudo tornou-se ainda mais evidente quando foram comparadas as relações entre as subescalas de ambas as escalas ALSFRS-R/BR (dividida nas subescalas bulbar, motor fino, tronco e

respiratório) e ALSAQ-40/BR (dividida nas subescalas mobilidade física, AVD e independência, alimentação e deglutição, comunicação e reações emocionais). Isto foi demonstrado entre as subescalas bulbar e alimentação, motor fino e AVD, e tronco com mobilidade, respectivamente.

Estes achados denotam que a funcionalidade interfere diretamente na qualidade de vida dos participantes, principalmente naqueles quesitos relacionados à deglutição e alimentação, interferindo tanto no quadro nutricional quanto no risco de broncoaspiração, como também na possibilidade em ter habilidade de realizar atividades cotidianas com independência ou manter a mobilidade preservada por tempo prolongado.

Deste modo, acompanhar as mudanças na mobilidade e deglutição podem fornecer informações sobre declínio funcional e, conseqüentemente, a redução da qualidade de vida.

Buscando avaliar a relação das concentrações de neopterin plasmática com a funcionalidade, a qualidade de vida e a CVF, os dados encontrados neste trabalho expuseram uma correlação considerada significativa entre as associações de neopterin com os escores da escala ALSFRS-R/BR, da subescala tronco (da escala ALSFRS-R/BR) e de CVF, bem como da correlação negativa na subescala de mobilidade (da escala ALSAQ-40/BR) devido a graduação de pontuação invertida, conforme justificado no texto acima.

A análise destes dados permite inferir que há uma tendência significativa ao mostrar que a neopterin sofre influência e, por conseguinte, ocorre diminuição de suas concentrações, à medida que há progressão da funcionalidade, qualidade de vida e CVF, principalmente nos quesitos tronco e mobilidade.

Desta forma, destaca-se que a diminuição de neopterin, e conseqüentemente o consumo de BH<sub>4</sub>, tende a refletir a piora clínica dos indivíduos portadores de ELA. Esta tendência poderá ser confirmada com um número maior de participantes no estudo.

Os valores médios do IMC na pesquisa foram normais. Entretanto, como o IMC foi do momento da entrevista, não foi possível avaliar se houve perda ponderal desde o diagnóstico da ELA.

A dieta é um fator modificável que pode potencialmente compensar para o aumento da demanda de energia ou um IMC mais baixo em pacientes com ELA, influenciando a forma como a doença progride no indivíduo.

Em nossa casuística foram observados maiores consumos de frutas e vegetais, seguidos de laticínios e carnes vermelhas. Estes dados são concordantes com um trabalho transversal que avaliou 302 portadores de ELA com duração dos sintomas menor ou igual a 18 meses, que apontou para um maior cuidado nutricional deva ser considerado em promover a ingestão de frutas e vegetais em pacientes com ELA, devido aos benefícios que estes proporcionam (NIEVES *et al.*, 2016).

Os exames laboratoriais em pacientes com ELA são realizados para excluir outras doenças que possam coexistir ou que impliquem um diagnóstico diferencial. Estes podem expressar atividade de CPK elevada precedendo a atrofia muscular e refletindo a denervação muscular no estágio inicial (ITO *et al.*, 2019).

Ademais, a CPK tende a diminuir em fases mais tardias da doença pela perda de massa muscular (LIMA; EVANGELISTA; CARVALHO, 2003). Neste sentido, apesar dos valores médios da CPK serem normais, diferentemente de literatura que mostrou aumento no CPK em amostra que estudou 87 participantes com ELA (LIMA; EVANGELISTA; CARVALHO, 2003), notou-se que em nossa casuística apontava para uma relação direta entre as atividades de CPK, aldolase, ALT e AST, inferindo que aumentos simultâneos proporcionais destas enzimas costumam ocorrer na presença de lesão muscular.

Estes dados são divergentes do encontrado na literatura, incluindo uma revisão sistemática e meta-análise que percebeu aumento dos níveis de CPK embora estes níveis não pareceram afetar a sobrevivência de indivíduos com ELA (CHENG; CHEN; SHANG, 2021).

## 8 CONCLUSÕES

No presente estudo foram fornecidas informações abrangentes acerca de dados epidemiológicos, características clínicas, bioquímicas e de mutações genéticas em participantes portadores de ELA, em um hospital de referência estadual. Os resultados encontrados fornecem uma avaliação epidemiológica e clínica pioneira descrita no estado de Santa Catarina.

A ELA é uma doença neurodegenerativa clinicamente definida como uma síndrome clinicamente heterogênea que cursa com fraqueza e atrofia muscular, caracterizada pelo acometimento do primeiro e segundo neurônio motor, e cujos mecanismos fisiopatológicos não têm sido ainda definidos.

O fato de ainda não ter se encontrado uma assinatura de biomarcadores deixa uma lacuna quanto a caracterização dos diferentes estágios clínicos da doença, bem como o diagnóstico clínico durante a fase inicial da doença.

Este trabalho tem contribuído na identificação de um biomarcador potencial que poderá auxiliar no diagnóstico da ELA, e na tomada de decisões no planejamento do tratamento farmacológico.

A grande vantagem de contar com a quantificação de neopterina no plasma de indivíduos acometidos por ELA, se encontra no fácil acesso para a sua determinação, a qual está baseada no uso de kits comerciais já estabelecidos no mercado. Estes kits comerciais apresentam uma boa sensibilidade e especificidade, que é comparável com o método de referência mundial para esta quantificação, a cromatografia líquida de alto rendimento acoplado a detecção de fluorescência.

Baseados nos dados gerados neste trabalho podemos observar que as características clínicas e demográficas da doença são muito similares às aquelas já descritas no resto do país e no mundo e traz dados pioneiros ao estado de Santa Catarina.

Embasados na análise realizada deste estudo, chama-se atenção aos preditores clínicos de duração de tempo entre o início dos sintomas até o diagnóstico, com maior atraso diagnóstico para aqueles indivíduos com idades mais jovens no início dos sintomas. Nesta mesma vertente, o preditor de pior qualidade de vida esteve relacionado com a escala de funcionalidade, realçando recomendações de aspectos de suma relevância para a prática clínica.

A identificação que a neopterina se encontra diminuída na maioria dos participantes, a respeito do grupo de voluntários saudáveis, sugere que o metabolismo da BH4 está comprometido, e que potencialmente a administração de BH4 poderia ser empregada com um tratamento coadjuvante da doença.

Esta proposta poderá redirecionar e sugerir, após a confirmação dos achados com um número maior de participantes e replicado por pares, que medicamentos já existentes aprovados pela FDA e pela ANVISA possam, no futuro, ser indicados para novos usos (uso *off-label*). O dicloridrato de sapropterina, como exemplo, é um BH4 sintético que tem sido usado em milhares de pacientes em todo o mundo desde 2007 para tratar fenilcetonúria e deficiências hereditárias de BH4.

Portanto, esta proposta pode resultar, se confirmada por novas pesquisas no futuro, no uso *off-label* de um medicamento permeável à BHE que não apresenta toxicidade e demonstrou melhorar a atividade cerebral em pacientes fenilcetonúricos (CHRIST *et al.*, 2013). Esta perspectiva pode acarretar novas oportunidades e benefícios, não só à comunidade acadêmica, mas, essencialmente, a indivíduos que sejam afetados por esta devastadora doença.

O presente estudo destaca também a importância da diversidade dos fatores que se mostraram relacionados com a qualidade de vida e funcionalidade na ELA, e ressalta a importância da implantação de uma equipe multidisciplinar que deve orientar a gestão do cuidado destes pacientes como também atentar para fatores precipitantes de pior prognóstico, buscando uma maior sobrevida.



## 9 LIMITAÇÕES

Devido a dificuldades inerentes e comuns a indivíduos portadores de ELA, como dificuldade de locomoção ou restrição ao leito, apesar destes terem expressado vontade em participar, muitos deles não puderam se deslocar até ao hospital, e por conseguinte, não foi possível obter seus registros. Além disto, foi possível realizar entrevistas domiciliares apenas na região da grande Florianópolis, não abrangendo o restante do estado, devido principalmente a questões de logística durante uma pandemia mundial em curso.

Tendo em vista a peculiaridade da distribuição geográfica de nossa cidade em Santa Catarina, os participantes que residiam mais próximos de Florianópolis tiveram maior representatividade nesta amostra já que possuíam menor distância de deslocamento.

Como o projeto de pesquisa transcorreu durante a pandemia da COVID-19, trazendo limitações físicas e de circulação de pessoas, não foi possível realizar amostras seriadas dos participantes. Desta forma, como perspectiva, novas pesquisas necessitam ser realizadas para aumentar o número de participantes e termos a oportunidade de realizar avaliações seriadas nestes indivíduos.

Uma outra limitação do estudo foi a neopterinina não ter sido analisada em outros fluídos corporais, como urina e LCR. Estas limitações podem servir de fonte de inspiração para futuras pesquisas.

Entendemos que, apesar da limitação da pequena amostra avaliada, a quantificação do metabolismo da BH4 em fluídos biológicos também poderá prever a progressão da doença. Caso isso seja demonstrado, este estudo permitirá abrir novos horizontes terapêuticos, visando restabelecer as concentrações neurais de BH4 e dessa forma promover maior expectativa e qualidade de vida.

A quantificação destes biomarcadores poderá se transformar numa ferramenta útil na prática clínica para prever a presença ou ainda o curso da doença.

Outra limitação deste estudo está relacionada à mensuração do IMC dos participantes, o qual se restringiu exclusivamente ao momento da entrevista. Dessa forma, não foi possível comparar com valores de IMC dos participantes

quando do início dos sintomas. Esta limitação pode ter contribuído para a falsa impressão de não ter havido perda ponderal neste grupo de indivíduos.

Da mesma forma, os dados da espirometria e CVF foram a partir de exames retrospectivos trazidos pelo participante, podendo não ter sido possível fornecer dados de tempo real ao momento da entrevista.

É importante enfatizar que o painel de mutações genéticas realizado em nossa pesquisa não avaliou a presença da mutação no gene *C9orf72*, um dos genes mais prevalentes entre pacientes com ELA no país.

Assim, estudos adicionais são necessários para determinar se essas observações representam um viés de amostragem ou possam refletir um fenômeno biológico.

## 10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo examinou aspectos socioeconômicos, clínicos, bioquímicos e genéticos em indivíduos afetados pela ELA no estado de Santa Catarina. Por se enquadrar como uma doença rara, denota-se sua especial relevância ao colaborar com a epidemiologia e caracterização deste público, tanto em território estadual quanto nacional.

Estas características estão de acordo com estudos anteriores e ratificam várias características clínicas comuns a indivíduos portadores de ELA, assemelhando os achados do nosso estado aos outros estados da federação e aos estudados no país, apesar das diferenças regionais.

Os resultados do trabalho puderam trazer uma nova perspectiva em relação a um potencial biomarcador na ELA.

A identificação de valores diminuídos de neopterina no plasma de participantes portadores de ELA foi possível por terem sido comparados com grupo controle rigorosamente selecionado, e não baseado em valores históricos, como comumente usado na literatura.

Desta maneira, este trabalho abre perspectivas de estudos futuros nesta área, como estudar o metabolismo de BH4 no sangue, urina, saliva e fezes com a justificativa de avaliar se a diminuição de neopterina plasmática possa ser convertida em um biomarcador de alerta sobre a evolução clínica do paciente afetado por ELA.

Outra perspectiva futura de trabalho seria a avaliação do microbioma nos portadores de ELA. É sabido que na ELA existe uma alteração na composição qualitativa e quantitativa dos microrganismos que compõem o microbioma. O que não tem sido definido ainda, é se o microbioma contribui de forma exógena para as concentrações dos metabólitos do metabolismo da BH4.

Por fim, a inclusão do teste genético nos painéis moleculares para a investigação das principais mutações gênicas deve ser fortemente considerada para ter a possibilidade de mapear as principais características destas mutações em indivíduos portadores de ELA no estado de Santa Catarina.

## REFERÊNCIAS

- ABE, Koji *et al.* Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **The Lancet Neurology**, [S. l.], v. 16, n. 7, p. 505–512, 2017. DOI: 10.1016/S1474-4422(17)30115-1.
- AL-CHALABI, Ammar *et al.* Analysis of amyotrophic lateral sclerosis as a multistep process: A population-based modelling study. **The Lancet Neurology**, [S. l.], v. 13, n. 11, p. 1108–1113, 2014. DOI: 10.1016/S1474-4422(14)70219-4.
- AL-CHALABI, Ammar; VAN DEN BERG, Leonard H.; VELDINK, Jan. Gene discovery in amyotrophic lateral sclerosis: Implications for clinical management. **Nature Reviews Neurology**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 96–104, 2017. DOI: 10.1038/nrneurol.2016.182.
- ALENCAR, Mariana Asmar *et al.* Quality of life, disability, and clinical variables in amyotrophic lateral sclerosis. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, [S. l.], 2021. DOI: 10.1590/0004-282x-anp-2021-0201.
- ALMER, Gabriele *et al.* Inducible nitric oxide synthase up-regulation in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of Neurochemistry**, [S. l.], v. 72, n. 6, 1999. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1999.0722415.x.
- ANDERSEN, Peter Munch *et al.* Good practice in the management of amyotrophic lateral sclerosis: Clinical guidelines. An evidence-based review with good practice points. EALSC Working Group. **Amyotrophic Lateral Sclerosis**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 195–213, 2007. DOI: 10.1080/17482960701262376.
- BAIER-BITTERLICH, Gabriele *et al.* Effect of neopterin and 7,8-dihydroneopterin on tumor necrosis factor- $\alpha$  induced programmed cell death. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 364, n. 2, 1995. DOI: 10.1016/0014-5793(95)00403-V.
- BAIER-BITTERLICH, Gabriele *et al.* Role of neopterin and 7,8-dihydroneopterin in human immunodeficiency virus infection: Marker for disease progression and pathogenic link. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, [S. l.], v. 13, n. 2, 1996. DOI: 10.1097/00042560-199610010-00010.
- BARBER, Siân C.; MEAD, Richard J.; SHAW, Pamela J. Oxidative stress in ALS: A mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1762, 2006. DOI: 10.1016/j.bbadis.2006.03.008.
- BARBER, Siân C.; SHAW, Pamela J. Oxidative stress in ALS: Key role in motor neuron injury and therapeutic target. **Free Radical Biology and Medicine**, 2010. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.018.

BENATAR, Michael *et al.* ALS biomarkers for therapy development: state of the field and future directions. **Muscle and Nerve**, [S. l.], v. 53, n. 2, p. 169–182, 2016. DOI: 10.1002/mus.24979.

BERTOLAZI, Alessandra Naimaier *et al.* Portuguese-language version of the epworth sleepiness scale: Validation for use in Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [S. l.], v. 35, n. 9, p. 877–883, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1806-37132009000900009>. Acesso em: 15 dez. 2021.

BLAU, Nenad; BONAFÉ, Luisa; THÖNY, Beat. Tetrahydrobiopterin deficiencies without hyperphenylalaninemia: Diagnosis and genetics of DOPA-responsive dystonia and sepiapterin reductase deficiency. **Molecular Genetics and Metabolism**, [S. l.], v. 74, n. 1–2, p. 172–185, 2001. DOI: 10.1006/mgme.2001.3213.

BOURKE, Stephen C. *et al.* Effects of non-invasive ventilation on survival and quality of life in patients with amyotrophic lateral sclerosis: A randomised controlled trial. **Lancet Neurology**, [S. l.], v. 5, n. 2, 2006. DOI: 10.1016/S1474-4422(05)70326-4.

BRACHER, Andreas *et al.* Biosynthesis of pteridines: NMR studies on the reaction mechanisms of GTP cyclohydrolase I, pyruvoyltetrahydropterin synthase, and sepiapterin reductase. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 273, n. 43, 1998. DOI: 10.1074/jbc.273.43.28132.

BRETTSCHEIDER, Julia *et al.* Axonal damage markers in cerebrospinal fluid are increased in ALS. **Neurology**, [S. l.], v. 66, n. 6, 2006. DOI: 10.1212/01.wnl.0000203120.85850.54.

BROOKS, Benjamin Rix. El escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, [S. l.], v. 124, n. suppl., p. 96–107, 1994. DOI: 10.1016/0022-510X(94)90191-0.

BROOKS, Benjamin Rix *et al.* El Escorial revisited: Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. **Amyotrophic Lateral Sclerosis**, [S. l.], v. 1, n. 5, p. 293–299, 2000. DOI: 10.1080/146608200300079536.

BROWN, Robert H.; AL-CHALABI, Ammar. Amyotrophic Lateral Sclerosis. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 377, n. 2, p. 162–172, 2017. DOI: 10.1056/NEJMra1603471. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1603471>. Acesso em: 21 set. 2021.

BYRNE, Susan *et al.* Aggregation of neurologic and neuropsychiatric disease in amyotrophic lateral sclerosis kindreds: A population-based case-control cohort study of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **Annals of Neurology**, [S. l.], v. 74, n. 5, 2013. DOI: 10.1002/ana.23969.

CARRIEDO, Sean G. *et al.* AMPA exposures induce mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro. **Journal of**

**Neurosciense**, v.20, n. 1, p. 240-50, 2000. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.20-01-00240.2000.

CARVALHO, Mamede de *et al.* Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. **Clinical Neurophysiology**, [S. l.], v. 119, n. 3, p. 497–503, 2008. DOI: 10.1016/j.clinph.2007.09.143.

CHADI, Gerson *et al.* Genetic analysis of patients with familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis in a Brazilian Research Center. **Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration**, [S. l.], v. 18, n. 3-4, p. 249-255, 2017. DOI: 10.1080/21678421.2016.1254245.

CHANDRASOMA, Brooke *et al.* Pulmonary function in patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis at disease onset. **Monaldi Archives for Chest Disease - Pulmonary Series**, [S. l.], v. 77, n. 3–4, p. 129–133, 2012. DOI: 10.4081/monaldi.2012.146.

CHEN, Sheng *et al.* Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update. **Molecular Neurodegeneration**, v. 8, n. 23, 2013. Disponível em: <http://www.molecularneurodegeneration.com/content/8/1/28>. Acesso em: 22 nov. 2021.

CHENG, Yangfan; CHEN, Yongping; SHANG, Huifang. Aberrations of biochemical indicators in amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. **Translational Neurodegeneration**, v. 10, n. 3, 2021. DOI: 10.1186/s40035-020-00228-9.

CHIÒ, Adriano *et al.* Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review of the published literature. **Neuroepidemiology**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 118–130, 2013. DOI: 10.1159/000351153.

CHRIST, Shawn E. *et al.* The effects of tetrahydrobiopterin (BH4) treatment on brain function in individuals with phenylketonuria. **NeuroImage: Clinical**, [S. l.], v. 3, 2013. DOI: 10.1016/j.nicl.2013.08.012.

CIERVO, Yuri; NING, Ke; JUN, Xu; SHAW, Pamela J.; MEAD, Richard J. Advances, challenges and future directions for stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis. **Molecular Neurodegeneration** BioMed Central Ltd., , 2017. DOI: 10.1186/s13024-017-0227-3.

CINTRA, Vivian Pedigone *et al.* The frequency of the C9orf72 expansion in a Brazilian population. **Neurobiology of Aging**, [S. l.], v. 66, 2018. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.01.007.

CIRILLO, Plinio *et al.* Neopterin induces pro-atherothrombotic phenotype in human coronary endothelial cells. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, [S. l.], v. 4, n. 10, 2006. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.02125.x.

COOPER-KNOCK, Johnathan; SHAW, Pamela J.; KIRBY, Janine. The widening spectrum of C9ORF72-related disease; Genotype/phenotype

correlations and potential modifiers of clinical phenotype. **Acta Neuropathologica**, n. 127, v. 3, p. 333–345, 2014. DOI: 10.1007/s00401-014-1251-9.

COUTO, Christian Marques *et al.* A Brazilian multicentre study on the clinical and epidemiological profiles of 1116 patients with amyotrophic lateral sclerosis and its phenotypic variants. **Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration**, [S. l.], 2021. DOI: 10.1080/21678421.2021.2007953.

CRONIN, Shane J. F. *et al.* The metabolite BH4 controls T cell proliferation in autoimmunity and cancer. **Nature**, [S. l.], v. 563, n. 7732, p. 564–568, 2018. DOI: 10.1038/s41586-018-0701-2. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0701-2>. Acesso em: 15 out. 2021.

DIAF. **Lista dos pacientes acometidos por ELA que utilizam medicamento riluzol**. Florianópolis: DIAF, 2021.

ESPÍNDOLA, Gisele; SCHEFFER, Débora da Luz; LATINI, Alexandra. Commentary: urinary neopterin, a new marker of the neuroinflammatory status in amyotrophic lateral sclerosis. **Frontiers in Neuroscience**, 2021. DOI: 10.3389/fnins.2021.645694.

FATTORI, Bruno *et al.* Assessment of swallowing by oropharyngo-oesophageal scintigraphy in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **Dysphagia**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 280–286, 2006. DOI: 10.1007/s00455-006-9052-5.

FEDDERMANN-DEMONT, Nina *et al.* Prevalence of potential sports-associated risk factors in Swiss amyotrophic lateral sclerosis patients. **Brain and Behavior**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 1–10, 2017. DOI: 10.1002/brb3.630.

FERRAIUOLO, Laura. The non-cell-autonomous component of ALS: new *in vitro* models and future challenges. **Biochemical Society Transactions**, [S. l.], v. 42, n. 5, p. 1270–1274, 2014. DOI: 10.1042/BST20140168.

FERRANTE, Robert J.; BROWNE, Susan E.; SHINOBU, Leslie A.; BOWLING, Allen C.; BAIK, M. Jay; MACGARVEY, Usha; KOWALL, Neil W.; BROWN, Robert H.; BEAL, M. Flint. Evidence of Increased Oxidative Damage in Both Sporadic and Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Journal of Neurochemistry**, [S. l.], v. 69, n. 5, p. 2064–2074, 2002. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1997.69052064.x.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **About Biomarkers and Qualification**. 2021. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/biomarker-qualification-program/about-biomarkers-and-qualification>. Acesso em: 27 jan. 2022.

FRANSCINI, Nicola *et al.* Critical role of interleukin-1beta for transcriptional regulation of endothelial 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, [S. l.], v. 23, n. 11, 2003. DOI: 10.1161/01.atv.0000099785.65848.f1.

FREGONEZI, Guilherme *et al.* Muscle impairment in neuromuscular disease using an expiratory/inspiratory pressure ratio. **Respiratory Care**, [S. l.], v. 60, n. 4, p. 533–539, 2015. DOI: 10.4187/respcare.03367.

FUJITA, Masahide *et al.* Sepiapterin Reductase Inhibition Leading to Selective Reduction of Inflammatory Joint Pain in Mice and Increased Urinary Sepiapterin Levels in Humans and Mice. **Arthritis and Rheumatology**, [S. l.], v. 72, n. 1, p. 57–66, 2020. DOI: 10.1002/art.41060.

GHISONI, Karina *et al.* Neopterin acts as an endogenous cognitive enhancer. **Brain, Behavior, and Immunity**, [S. l.], v. 56, 2016. DOI: 10.1016/j.bbi.2016.02.019.

GHISONI, Karina *et al.* Cerebrospinal fluid neopterin is brain-derived and not associated with blood-CSF barrier dysfunction in non-inflammatory affective and schizophrenic spectrum disorders. **Journal of Psychiatric Research**, v. 47, n. 10, p. 1417-1422, 2015. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2015.02.002.

GHISONI, Karina *et al.* Neopterin as a potential cytoprotective brain molecule. **Journal of Psychiatric Research**, [S. l.], v. 71, p. 134–139, 2015a. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2015.10.003.

GHISONI, Karina *et al.* Neopterin as a potential cytoprotective brain molecule. **Journal of Psychiatric Research**, [S. l.], v. 71, p. 134–139, 2015b. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2015.10.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2015.10.003>.

GOMES, Crystian Moraes Silva *et al.* Funcionalidade e qualidade de vida de pessoas com esclerose lateral amiotrófica e percepção da sobrecarga e apoio social de cuidadores informais. **Acta Fisiátrica**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 167–173, 2021. DOI: 10.11606/issn.2317-0190.v27i3a172216.

GONÇALVES, João Pedro Nunes *et al.* Genetic epidemiology of familial ALS in Brazil. **Neurobiology of Aging**, [S. l.], v. 102, p. 227, 2021. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2021.01.007.

GREEN, Colin *et al.* Patients' health-related quality-of-life and health state values for motor neurone disease/amyotrophic lateral sclerosis. **Qual Life Res.**, v. 12, n. 5, p. 565-74, 2003. DOI: 10.1023/a:1025052609818.

GUEDES, Keyte *et al.* Cross-cultural adaptation and validation of als functional rating scale-revised in Portuguese language. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, [S. l.], v. 68, n. 1, p. 44–47, 2010. DOI: 10.1590/s0004-282x2010000100010.

HADJIKOUTIS, Savvas; WILES, Charles Mark. Respiratory complications related to bulbar dysfunction in motor neuron disease. **Acta Neurologica Scandinavica**, [S. l.], v. 103, n. 4, p. 207–213, 2001. DOI: 10.1034/j.1600-0404.2001.d01-22.x.



HAGBERG, Lars *et al.* Open Access REVIEW Cerebrospinal fluid neopterin: an informative biomarker of central nervous system immune activation in HIV-1 infection. **AIDS Research and Therapy**, v. 7, n.15, 2010. Disponível em: <http://www.aidsrestherapy.com/content/7/1/15>. Acesso em: 17 nov. 2021.

HAGBERG, Lars *et al.* Cerebrospinal Fluid Neopterin Concentrations in Central Nervous System Infection. **Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 168, n. 5, p. 1285–1288, 1993. DOI: doi:10.1093/infdis/168.5.1285.

HARDIMAN, Orla; VAN DEN BERG, Leonard H.; KIERNAN, Matthew C. Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, n.7, v. 11, 2011. DOI: 10.1038/nrneurol.2011.153.

HOBSON, Esther V.; MCDERMOTT, Christopher J. Supportive and symptomatic management of amyotrophic lateral sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, . 12, v. 9, p. 526-38, 2016. DOI: 10.1038/nrneurol.2016.111.

HOFFMANN, Georg *et al.* Neopterin activates transcription factor nuclear factor-κB in vascular smooth muscle cells. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 391, n. 1–2, 1996. DOI: 10.1016/0014-5793(96)00729-6.

HULL, Melissa; PASINETTI, Giulio Maria; AISEN, Paul S. Elevated plasma neopterin levels in Alzheimer disease. **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, [S. l.], v. 14, n. 4, 2000. DOI: 10.1097/00002093-200010000-00007.

IBGE. **PNAD Contínua** - Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios Contínua. 2019. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/habitacao/17270-pnad-continua.html>. Acesso em: 20 dez. 2021.

INVITAE. **Invitae Hereditary Amyotrophic Lateral Sclerosis, Frontotemporal Dementia and Alzheimer Disease Panel**. 2021. Disponível em: [https://www.invitae.com/en/physician/tests/03502/#info-panel-disorders\\_tested](https://www.invitae.com/en/physician/tests/03502/#info-panel-disorders_tested). Acesso em: 12 jun. 2021.

ISHII, Masakazu *et al.* Reduction of GTP cyclohydrolase I feedback regulating protein expression by hydrogen peroxide in vascular endothelial cells. **Journal of Pharmacological Sciences**, [S. l.], v. 97, n. 2, 2005. DOI: 10.1254/jphs.SC0040146.

ITO, Daisuke *et al.* Elevated serum creatine kinase in the early stage of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of Neurology**, [S. l.], v. 266, n. 12, p. 2952–2961, 2019. DOI: 10.1007/s00415-019-09507-6.

Jl, Ai Ling *et al.* Genetics insight into the amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia spectrum. **Journal of Medical Genetics**, [S. l.], v. 54, n. 3, p. 145–154, 2017. DOI: 10.1136/jmedgenet-2016-104271.

- KAUFMAN, Seymour. New Tetrahydrobiopterin-Dependent Systems. **Annual Review of Nutrition**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 261–286, 1993. DOI: 10.1146/annurev.nu.13.070193.001401.
- KIRKPATRICK, Sharon I. *et al.* Dietary assessment in food environment research: a systematic review. **American Journal of Preventive Medicine**, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 94–102, 2014. DOI: 10.1016/j.amepre.2013.08.015.
- KOUTSILIERI, E.; SCHELLER, C.; TRIBL, F.; RIEDERER, P. Degeneration of neuronal cells due to oxidative stress - Microglial contribution. **Parkinsonism and Related Disorders**, 2002. DOI: 10.1016/S1353-8020(02)00021-4.
- KUEHNE, Leonie K. *et al.* Cerebrospinal fluid neopterin is brain-derived and not associated with blood-CSF barrier dysfunction in non-inflammatory affective and schizophrenic spectrum disorders. **Journal of Psychiatric Research**, [S. l.], v. 47, n. 10, p. 1417–1422, 2013. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2013.05.027.
- LATINI, Alexandra *et al.* Tetrahydrobiopterin improves hippocampal nitric oxide-linked long-term memory. **Molecular Genetics and Metabolism**, [S. l.], v. 125, n. 1–2, p. 104–111, 2018. DOI: 10.1016/j.ymgme.2018.06.003.
- LATINI, Alexandra *et al.* Oxidative Stress: Neuropathy, Excitability, and Neurodegeneration. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], v. 2019, p. 1–2, 2019. DOI: 10.1155/2019/2715326.
- LATREMOLIERE, Alban *et al.* Reduction of neuropathic and inflammatory pain through inhibition of the tetrahydrobiopterin pathway. **Neuron**, [S. l.], v. 86, n. 6, p. 1393–1406, 2015. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.05.033.
- LEBLHUBER, Friedrich *et al.* Activated immune system in patients with Huntington's disease. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, [S. l.], v. 36, n. 10, 1998. DOI: 10.1515/CCLM.1998.132.
- LEVINE, Robert A. *et al.* Immunological evidence for the requirement of sepiapterin reductase for tetrahydrobiopterin biosynthesis in brain. **Journal of Neurochemistry**, [S. l.], v. 54, n. 4, 1990. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1990.tb01951.x.
- LIMA, Ana Furtado; EVANGELISTA, Terezinha; CARVALHO, Mamede de. Increased creatine kinase and spontaneous activity on electromyography, in amyotrophic lateral sclerosis. **Electromyography and Clinical Neurophysiology**, [S. l.], v. 43, n. 3, p.189-93, 2003.
- LINDEN-JUNIOR, Eduardo *et al.* Prevalence of amyotrophic lateral sclerosis in the city of porto alegre, in southern Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, [S. l.], v. 71, n. 12, p. 959–962, 2013. DOI: 10.1590/0004-282X20130177.
- LIU, Jia; WANG, Fei. Role of neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: Cellular mechanisms and therapeutic implications. **Frontiers in Immunology**, 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01005.

- LONGO, Nicola. Disorders of biopterin metabolism. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 32, n. 3, p. 333-342, 2009. DOI: 10.1007/s10545-009-1067-2.
- LUCAS, Ricardo Dantas de *et al.* Increased platelet oxidative metabolism, blood oxidative stress and neopterin levels after ultra-endurance exercise. **Journal of Sports Sciences**, [S. l.], v. 32, n. 1, 2014. DOI: 10.1080/02640414.2013.797098.
- LUNETTA, Christian *et al.* Urinary neopterin, a new marker of the neuroinflammatory status in amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of Neurology**, [S. l.], v. 267, n. 12, p. 3609–3616, 2020. DOI: 10.1007/s00415-020-10047-7.
- MARIN, Benoît *et al.* Clinical and demographic factors and outcome of amyotrophic lateral sclerosis in relation to population ancestral origin European. **Journal of Epidemiology**, Springer Netherlands, 2016. DOI: 10.1007/s10654-015-0090-x.
- MARTINS, Roberta de Paula *et al.* Neopterin preconditioning prevents inflammasome activation in mammalian astrocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 115, p. 371–382, 2018. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.11.022.
- MATHIS, Stéphane *et al.* Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: A review. **Journal of the Neurological Sciences**, 2019. DOI: 10.1016/j.jns.2019.02.030. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30870681/>. Acesso em: 20 out. 2021.
- MATIOLLO, Camila *et al.* Elevated neopterin levels are associated with acute-on-chronic liver failure and mortality in patients with liver cirrhosis. **Digestive and Liver Disease**, [S. l.], v. 52, n. 7, 2020. DOI: 10.1016/j.dld.2020.03.024.
- MCGEER, Patrick L.; MCGEER, Edith G. Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. **Muscle and Nerve**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 459–470, 2002. DOI: 10.1002/mus.10191.
- MEJZINI, Rita *et al.* ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? **Frontiers in Neuroscience**, [S. l.], v. 13, 2019. DOI: 10.3389/fnins.2019.01310.
- MISHRA, Pooja Shree *et al.* Astroglia acquires a toxic neuroinflammatory role in response to the cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients. **Journal of Neuroinflammation**, [S. l.], v. 13, n. 1, 2016. DOI: 10.1186/s12974-016-0698-0.
- MITSUMOTO, Hiroshi; RABKIN, Judith G. Palliative care for patients with amyotrophic lateral sclerosis: “Prepare for the worst and hope for the best”

**Journal of the American Medical Association**, v. 298, n. 2, p. 207-216, 2007. DOI: 10.1001/jama.298.2.207.

NIEVES, Jeri W. *et al.* Association between dietary intake and function in amyotrophic lateral sclerosis. **JAMA Neurology**, [S. l.], v. 73, n. 12, p. 1425–1432, 2016. DOI: 10.1001/jamaneurol.2016.3401.

OBRADOR, Elena *et al.* The link between oxidative stress, redox status, bioenergetics and mitochondria in the pathophysiology of ALS. **International Journal of Molecular Sciences**, 2021. DOI: 10.3390/ijms22126352.

ONG, Mei Lyn; TAN, Pei Fang; HOLBROOK, Joanna D. Predicting functional decline and survival in amyotrophic lateral sclerosis. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 4, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0174925.

PAGANONI, Sabrina *et al.* Long-term survival of participants in the CENTAUR trial of sodium phenylbutyrate-taurursodiol in amyotrophic lateral sclerosis. **Muscle and Nerve**, [S. l.], v. 63, n. 1, p. 31–39, 2021. DOI: 10.1002/mus.27091. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mus.27091>. Acesso em: 20 dez. 2021.

PAVAN, Karina *et al.* Adaptação transcultural do questionário de avaliação da esclerose lateral amiotrófica (ALSAQ-40) na cultura e linguagem brasileira. **Medicina de Reabilitação**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 73-76, 2007.

PAVAN, Karina *et al.* Validation of the Amyotrophic Lateral Sclerosis Assessment Questionnaire (ALSAQ-40) scale in the portuguese language. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, [S. l.], v. 68, n. 1, p. 48–51, 2010. DOI: 10.1590/s0004-282x2010000100011.

PEDRAZA, Dixis Figueroa; MENEZES, Tarciana Nobre de. Food frequency questionnaire developed and validated for the Brazilian population: a review of the literature. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.20, n. 9, p. 2697-720, 2015. DOI: 10.1590/1413-81232015209.12602014.

PHILIPS, Thomas.; ROTHSTEIN, Jeffrey D. Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. **Experimental Neurology**, 2014. DOI: 10.1016/j.expneurol.2014.05.015.

PINGLE, Shubhangi; TUMANE, Rajani; JAWADE, Aruna. Neopterin: Biomarker of cell-mediated immunity and potent usage as biomarker in silicosis and other occupational diseases. **Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine**, 2008. DOI: 10.4103/0019-5278.44690.

PINTO, Susana; PINTO, Anabela; CARVALHO, Mamede de. Do bulbar-onset amyotrophic lateral sclerosis patients have an earlier respiratory involvement than spinal-onset amyotrophic lateral sclerosis patients? **Europa Medica**, [S. l.], v. 43, n. 4, 2007.

PIRES, Ananda Staats *et al.* Kynurenine and tetrahydrobiopterin pathways crosstalk in pain hypersensitivity. **Frontiers in Neuroscience**, [S. l.], v. 24, , n. 14, p.620, 2020. DOI: 10.3389/fnins.2020.00620.

PISOSCHI, Aurelia Magdalena; POP, Aneta. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2015. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040.

PRADO, Laura de Godoy Rousseff *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis in Brazil: Case series and review of the Brazilian literature. **Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration**, [S. l.], v. 17, n. 3–4, p. 282–288, 2016. DOI: 10.3109/21678421.2016.1143011.

PUPILLO, Elisabetta *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis and food intake. **Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration**, [S. l.], v. 19, n. 3–4, p. 267–274, 2018. DOI: 10.1080/21678421.2017.1418002.

QUINN, Colin; ELMAN, Lauren. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Diseases. **Periferal Nerve and Motor Neuron Disorder**. v. 26, n. 5, p. 1323-1347, 2020. DOI: 10.1212/CON.0000000000000911.

RIVIERE, Marc *et al.* An analysis of extended survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis treated with riluzole. **Archives of Neurology**, [S. l.], v. 55, n. 4, p. 526–528, 1998. DOI: 10.1001/archneur.55.4.526.

ROSEN, Daniel R. *et al.* Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. **Nature**, [S. l.], v. 362, n. 6415, 1993. DOI: 10.1038/362059a0.

ROWLAND, Lewis P.; SHNEIDER, Neil A. The clinical diagnosis of ALS is probably correct in more than 95 percent of cases. 1 However, because. **The New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 344, n. 22, p. 1688–1700, 2001.

SAILER, Sabrina *et al.* The emerging physiological role of agmo 10 years after its gene identification. **Life**, v. 11, n. 2, p. 88, 2021. DOI: 10.3390/life11020088.

SASSANI, Matilde *et al.* Magnetic resonance spectroscopy reveals mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. **Brain**, [S. l.], v. 143, n. 12, 2020. DOI: 10.1093/brain/awaa340.

SAWADA, Makoto *et al.* Tyrosine Hydroxylase, Tryptophan Hydroxylase, Biopterin, and Neopterin in the Brains of Normal Controls and Patients with Senile Dementia of Alzheimer Type. **Journal of Neurochemistry**, [S. l.], v. 48, n. 3, p. 760–764, 1987. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1987.tb05582.x.

SCHOBERSBERGER, Wolfgang *et al.* Neopterin and 7,8-dihydroneopterin induce apoptosis in the rat alveolar epithelial cell line L2. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 397, n. 2–3, 1996. DOI: 10.1016/S0014-5793(96)01194-5.

SHAMSHIRI, Hosein *et al.* Trends of quality of life changes in amyotrophic lateral sclerosis patients. **Journal of the Neurological Sciences**, [S. l.], v. 368, p. 35–40, 2016. DOI: 10.1016/j.jns.2016.06.056.

SHEFNER, Jeremy M. *et al.* A proposal for new diagnostic criteria for ALS. **Clinical Neurophysiology**, v. 131, n. 8, p. 1975-1978, 2020. DOI: 10.1016/j.clinph.2020.04.005.

SHEPHEARD, Stephanie R. *et al.* Urinary neopterin: a novel biomarker of disease progression in amyotrophic lateral sclerosis. **European Journal of Neurology**, 2021. DOI: 10.1111/ene.15237.

SMITH, Emma F.; SHAW, Pamela J.; DE VOS, Kurt J. The role of mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis. **Neuroscience Letters**, 2019. DOI: 10.1016/j.neulet.2017.06.052.

SPREUX-VAROQUAUX, Odile. *et al.* Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: A reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. **Journal of the Neurological Sciences**, [S. l.], v. 193, n. 2, 2002. DOI: 10.1016/S0022-510X(01)00661-X.

TAKEDA, Takahiro; KITAGAWA, Kazuo; ARAI, Kimihito. Phenotypic variability and its pathological basis in amyotrophic lateral sclerosis. **Neuropathology**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 40–56, 2020. DOI: 10.1111/neup.12606.

TANI, Yoshihiro *et al.* Decrease in 6R-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin content in cerebrospinal fluid of autistic patients. **Neuroscience Letters**, [S. l.], v. 181, n. 1–2, p. 169–172, 1994. DOI: 10.1016/0304-3940(94)90586-X. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/030439409490586X>. Acesso em: 20 dez. 2021.

TAYEH, Mahmoud A.; MARLETTA, Michael A. Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 264, n. 33, 1989. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)47163-9.

TEGEDER, Irmgard *et al.* GTP cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin regulate pain sensitivity and persistence. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 12, n. 11, 2006. DOI: 10.1038/nm1490.

THÖNY, Beat; AUERBACH, Günter; BLAU, Nenad. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. **Biochemical Journal**, 2000. DOI: 10.1042/0264-6021:3470001.

TOBIN, Jennifer E. *et al.* Sepiapterin reductase expression is increased in Parkinson's disease brain tissue. **Brain Research**, [S. l.], v. 1139, n. 1, 2007. DOI: 10.1016/j.brainres.2007.01.001.

- TOLLEFSEN, Ellin *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis: Gender differences in the use of mechanical ventilation. **European Journal of Neurology**, [S. l.], v. 17, n. 11, p. 1352–1357, 2010. DOI: 10.1111/j.1468-1331.2010.03036.x.
- TRILICO, Matheus Luis Castelan *et al.* Characterization of the amyotrophic lateral sclerosis-linked P56S mutation of the VAPB gene in Southern Brazil. **Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration**, [S. l.], v. 21, n. 3–4, p. 286–290, 2020. DOI: 10.1080/21678421.2020.1738495.
- VAN ES, Michael A. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis. **The Lancet**, [S. l.], v. 390, n. 10107, p. 2084–2098, 2017. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31287-4. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31287-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31287-4). Acesso em: 20 dez. 2021.
- VELDINK, Jan H. *et al.* Cluster RCT of case management on patients' quality of life and caregiver strain in ALS. **Neurology**, v.82, n. 1, p. 23-31, 2014. DOI: 10.1212/01.wnl.0000438227.48470.62.
- WEISS, Günter *et al.* Neopterin modulates toxicity mediated by reactive oxygen and chloride species. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 321, n. 1, 1993. DOI: 10.1016/0014-5793(93)80627-7.
- WERNECK, Lineu Cesar; SCOLA, Rosana Herminia. Characterization of the amyotrophic lateral sclerosis-linked P56S mutation of the VAPB gene in Southern Brazil. **Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration**, [S. l.], v. 21, n. 3–4, p. 286–290, 2020. DOI: 10.1080/21678421.2020.1738495.
- WERNER, Ernest R. *et al.* Tetrahydrobiopterin biosynthetic activities in human macrophages, fibroblasts, THP-1, and T 24 cells. GTP-cyclohydrolase I is stimulated by interferon- $\gamma$ , and 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase and sepiapterin reductase are constitutively present. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 265, n. 6, 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2154472/>. Acesso em: 12 nov. 2021.
- WERNER, Ernst R.; BLAU, Nenad; THÖNY, Beat. Tetrahydrobiopterin: Biochemistry and pathophysiology. **Biochemical Journal**, v. 438, n. 3, p. 397-414, 2011. DOI: 10.1042/BJ20110293.
- WERNER-FELMAYER, Gabriele *et al.* Neopterin Formation and Tryptophan Degradation by a Human Myelomonocytic Cell Line (THP-1) upon Cytokine Treatment. **Cancer Research**, [S. l.], v. 50, n. 10, 1990.
- WESTARP, Martin E. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis an enigmatic disease with b-cellular and anti-retroviral immune responses. **European Journal of Medicine**, [S. l.], v. 2, n. 6, 1993a.
- WESTARP, Martin E. *et al.* Neopterin,  $\beta$ 2-Microglobulin and Carbohydrate Antigen CA-19-9 in Sporadic Adult Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Pteridines**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 81–89, 1993b. DOI: 10.1515/pteridines.1993.4.2.81.

WESTARP, Martin E. *et al.* Neopterin, p2-Microglobulin, Tryptophan and Kynurenine In Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis Neopterin in sALS. **Pteridines**. 5 (4), 142-148, 1994. DOI: 10.1515/pteridines.1994.5.4.142.

WHO. Working Group. Use and interpretation of anthropometric indicators of nutritional status. WHO Working Group. **Bulletin of the World Health Organization**, [S. l.], v. 64, n. 6, p. 929–41, 1986. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3493862>. Acesso em: 15 nov. 2021.

WHO. **WHO-convened global study of origins of SARS-CoV-2: China Part**. 2021. <https://www.who.int/publications/i/item/who-convened-global-study-of-origins-of-sars-cov-2-china-part>. Acesso em: 15 nov. 2021.

WIDNER, Bernhard; LEBLHUBER, Friedrich; FUCHS, Dietmar. Increased neopterin production and tryptophan degradation in advanced Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, [S. l.], v. 109, n. 2, 2002. DOI: 10.1007/s007020200014.

WIDNER, Bernhard; LACCONE, Franco; FUCHS, Dietmar. Activated immune system in patients with Huntington's disease. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, [S. l.], v. 36, n. 10, 1998. DOI: 10.1515/CCLM.1998.132.

WIJEMANNE, Subhashie; JANKOVIC, Joseph. Dopa-responsive dystonia - Clinical and genetic heterogeneity. **Nature Reviews Neurology**, v. 11, n. 7, p. 414-424, 2015. DOI: 10.1038/nrneurol.2015.86.

WILBOURN, Asa J. Clinical neurophysiology in the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: the Lambert and the El Escorial criteria. **Journal of the neurological sciences**, [S. l.], v. 160, n. supl. 1, 1998. DOI: 10.1016/S0022-510X(98)00194-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9851644/>. Acesso em: 5 fev. 2022.

WILKINS, Heather M.; DIMACHKIE, Mazen M.; AGBAS, Abdulbaki. Blood-based Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *In*: ARAKI, Toshiyuki (ed.) **Amyotrophic Lateral Sclerosis**. cap. 6. 2021. DOI: 10.36255/exonpublications.amyotrophiclateralsclerosis.biomarkers.2021.

WISSMANN, Philipp *et al.* Immune activation in patients with Alzheimer's disease is associated with high serum phenylalanine concentrations. **Journal of the Neurological Sciences**, [S. l.], v. 329, n. 1–2, 2013. DOI: 10.1016/j.jns.2013.03.007.

YOKOI, Daichi *et al.* Age of onset differentially influences the progression of regional dysfunction in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of Neurology**, [S. l.], v. 263, n. 6, p. 1129–1136, 2016. DOI: 10.1007/s00415-016-8109-0.



YOSHIDA, Yoshihiro *et al.* Adenosine and neopterin levels in cerebrospinal fluid of patients with neurological disorders. **Internal Medicine**, [S. l.], v. 38, n. 2, p. 133–139, 1999. DOI: 10.2169/internalmedicine.38.133.

ZAREI, Sara *et al.* A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. **Surgical Neurology International**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 171, 2015. DOI: 10.4103/2152-7806.169561.

ZOCCOLELLA, Stefano *et al.* Predictors of delay in the diagnosis and clinical trial entry of amyotrophic lateral sclerosis patients: A population-based study. **Journal of the Neurological Sciences**, [S. l.], v. 250, n. 1–2, p. 45–49, 2006. DOI: 10.1016/j.jns.2006.06.027.

## LISTA DE TRABALHOS CIENTÍFICOS GERADOS DURANTE O MESTRADO

**ESPÍNDOLA, Gisele**; SCHEFFER, Débora da Luz; LATINI, Alexandra. Commentary: urinary neopterin, a new marker of the neuroinflammatory status in amyotrophic lateral sclerosis. **Frontiers in Neuroscience**, 2021. DOI: 10.3389/fnins.2021.645694.

SILVA, Maria Fernanda da; RIZZATTI, Sara; COLPANI, Clovis; SCHMMITT, Luisa; NIERO, Laís; **ESPÍNDOLA, Gisele**; EICHWALD, Tuany; PIRES, Ananda Christina Staats; SOUZA, Jennyffer; VAN DE SANDE-LEE, Simone; HOLH, Alexandre; CARVALHO, Humberto Jorge Gonçalves Moreira de; GASPAR, Joana M.; RONSONI, Marcelo Fernando; LATINI, Alexandra. Increased neopterin levels in the plasma of individuals affected by obesity: A systematic review and meta-analysis. Será submetido a *Frontiers in immunology*.

EICHWALD, Tuany; SILVA, Lucila de Bortoli da; SCHNORRENBERGER, Erick; NIERO, Lais; **ESPÍNDOLA, Gisele**; HUANG, Wei-Ling, ABDENUR, Jose; LATINI, Alexandra. The central tetrahydrobiopterin metabolism: Beyond its traditional cofactor properties. Será submetido a *Metabolic Brain Disease*

RODRIGUES, Cleonísio Leite, **ESPÍNDOLA, Gisele**. Neuropatias periféricas endocrinológicas, metabólicas e gastrointestinais, e do doente crítico in *Neuropatias Periféricas*. 1. ed. São Paulo: Editora Omnifarma LTDA, v. 1. p. 92-105, 2020.

LEAL, Eduardo Martins; AMARAL NETO, Antônio Serpa do; MARQUARDT, Matheus; VIEIRA, Gabriel de Deus; JULIEN, Elson Julius Shockness, ATHAYDE JUNIOR., Athos Tiradentes Andrade de, ATHAYDE JUNIOR., Willian Costa, QUEIROZ, Luiz Paulo de, **ESPÍNDOLA, Gisele**; OLIVEIRA, André Dias. Síndrome de Lambert-Eaton associada a Glioblastoma e Doença de Castleman. Exibido no XXII Fórum do Departamento Científico de Moléstias Neuromusculares da Academia Brasileira de Neurologia, evento realizado de forma online nos dias 05 e 06 de novembro de 2021.

**ESPÍNDOLA, Gisele**; SCHLINDWEIN-ZANINI, Rachel; LATINI, Alexandra Susana; LIN, Katia. Clinical-Epidemiological Profile Of Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis At A State Referral Center – Hupest/Ufsc. Foi apresentado na modalidade - Pôster, no evento XXIX Congresso Brasileiro de Neurologia ocorrido de 03 a 07 de setembro de 2021 na modalidade ONLINE.

**ESPÍNDOLA, Gisele**; LATINI, Alexandra. Inflammatory status in patients affected by Amyotrophic Lateral Sclerosis attended at a state referral center. Foi apresentado por na forma de Pôster no Current Topics in Biochemistry, 2021.

MARQUARDT, Matheus; AMARAL NETO, Antônio Serpa do; LEAL, Eduardo Martins; VIEIRA, Gabriel De Deus; OLIVEIRA, André Dias de; **ESPÍNDOLA, Gisele**. Esclerose lateral amiotrófica associada a parkinsonismo: uma manifestação atípica. Trabalho exposto no XIII CONGRESSO PAULISTA DE NEUROLOGIA, realizado nos dias 27, 28 e 29 de Maio de 2021.

LEAL, Eduardo Martins; PEREIRA JUNIOR, Glauco Cesario; AMARAL NETO, Antônio Serpa Do; MARQUARDT, Matheus; VIEIRA, Gabriel de Deus; OLIVEIRA, André Dias de; LIN, Katia; BERNARDI, Pricila; **ESPÍNDOLA, Gisele**. Atypical Presentation Of Charcot-Marie-Tooth Disease 4j. Foi apresentado na modalidade - Pôster, no evento XXIX Congresso Brasileiro de Neurologia ocorrido de 03 a 07 de setembro de 2021 na modalidade ONLINE.

VIEIRA, Gabriel De Deus; LEAL, Eduardo Martins; AMARAL NETO, Antônio Serpa do; MARQUARDT, Matheus; **ESPÍNDOLA, Gisele**; OLIVEIRA, André Dias de; NÓBREGA JUNIOR, Aducto Wanderley da; SCHLINDWEIN-ZANINI, Rachel; CAVAGNOLLO, Marcia Tatsch; QUEIROZ, Luiz Paulo de. Recurrence Of Miller Fisher Syndrome Associated With Asia Syndrome. Foi apresentado na modalidade - Pôster, no evento XXIX Congresso Brasileiro de Neurologia ocorrido de 03 a 07 de setembro de 2021 na modalidade ONLINE.

LEAL, Eduardo Martins; VIEIRA, Gabriel De Deus; MORAIS, Mayara Dos Santos; MARQUES, Isabela Zanellato; NÓBREGA JUNIOR, Aducto Wanderley; **ESPÍNDOLA, Gisele**; LIN, Katia. Avaliação do paciente com acidente vascular encefálico na era da COVID-19 - inovações no exame neurológico observacional. Boletim do Curso de Medicina da UFSC, v. 6, p. 45, 2020.

## APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Página 1 de 4

Prezado participante:

Estamos desenvolvendo a pesquisa **AVALIAÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA DE PACIENTES COM ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA ATENDIDOS EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE REFERÊNCIA ESTADUAL** que permitirá a investigação acerca dos aspectos clínicos, epidemiológicos e bioquímicos da Esclerose Lateral Amiotrófica em indivíduos atendidos neste hospital.

Você está sendo convidado (a) a participar, como voluntário (a) desta pesquisa. Para decidir se você quer ou não fazer parte, você deve entender os propósitos deste estudo, os riscos e benefícios potenciais. Estas informações detalhadas sobre este estudo serão discutidas com você. Assim que você compreender o estudo, você deverá assinar este formulário, se você quiser participar. Sua participação não é obrigatória e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador, seu acompanhamento clínico ou com a instituição.

O objetivo do trabalho é analisar as possíveis interações e associações entre fatores neurológicos, psicológicos/neuropsicológicos, fonoaudiológicos e pneumológicos de indivíduos com Esclerose Lateral Amiotrófica.

Os benefícios e vantagens em participar deste estudo serão que, com os resultados obtidos nas avaliações, os profissionais de saúde poderão qualificar a gravidade da doença e sua evolução.

O participante se beneficiará diretamente com o resultado das avaliações que serão realizadas, como avaliação de peso, altura, índice de massa corpórea, força muscular de membros superiores, inferiores e da respiração, prova de função pulmonar (espirometria), exame de imagem de videofluoroscopia da deglutição (ato de engolir), raspado bucal e biópsia de pele (por "punch"). No exame de videofluoroscopia da deglutição você poderá sentir desconforto, como enjoo e/ou náusea, podendo solicitar sua interrupção a qualquer momento. Poderá apresentar engasgos durante a ingestão de alimento ou líquido. Sempre que isto ocorrer, serão verificadas manobras de proteção das vias aéreas, para

que tais sinais sejam eliminados. Caso nenhuma das manobras aplicadas seja considerada efetiva, a avaliação será imediatamente interrompida e orientações sobre as consistências que deverão, ou não, serem ingeridas pela boca serão realizadas, a fim de prevenir aspirações e alterações pulmonares.

Na biópsia de pele podem ocorrer dor durante e após o procedimento, reação ao anestésico infiltrado, sangramento, formação de hematoma, inflamação e infecção da ferida operatória, ruptura da sutura, cicatrizes atróficas, hipertróficas, queloidianas, hipocrômicas ou hiperocrômicas.

Os materiais coletados (sangue e urina) serão utilizados exclusivamente para atender aos objetivos desta pesquisa e, caso haja sobra, serão devidamente eliminados ao final do estudo. Será necessária uma coleta simples de sangue venoso, em torno de 8 ml, e uma de urina, de 5 ml, como realizada para qualquer outro exame convencional já realizado anteriormente. O risco associado a este tipo de coleta é o de poder haver um pequeno derrame local (hematoma), que habitualmente não tem consequência além de um pequeno desconforto local.

A coleta via raspado bucal é simples e não apresenta nenhum risco. O teste é realizado de forma simples, indolor e rápida.

Também responderá a questionários, onde você lerá e responderá perguntas onde terá que assinalar uma resposta sobre sono, inteligência, depressão/ansiedade, memória, qualidade de vida, estado de saúde e funcional.

Caso você apresente algum problema em seus exames clínicos, será acompanhado (a) e encaminhado (a) quando necessário para tratamento adequado para sua doença. Todos os procedimentos serão realizados nas dependências do Hospital Universitário, que apresenta todo o suporte de emergência para lhe atender se necessário.

Além disso, você está isento de qualquer despesa tida pelos pesquisadores do presente estudo e dele decorrentes, e garante-se indenização decorrente de eventuais danos gerados pela pesquisa. Esta pesquisa está submetida à Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, e suas complementares, e os pesquisadores responsáveis declaram o cumprimento das

exigências contidas na mesma. Caso haja algum motivo relacionado ao projeto que possa implicar em ônus a você, esse será arcada pelos pesquisadores.

As avaliações serão realizadas no período de dois anos, sendo realizadas semestralmente, nas dependências do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina.

Será mantida a garantia de sigilo que assegure a sua privacidade, quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa, informando que somente serão divulgados dados diretamente relacionados aos objetivos da pesquisa. Os resultados obtidos nesse estudo serão utilizados para pesquisa, podendo ser apresentados em reuniões ou publicações científicas, no entanto, você não será identificado, preservando-se assim sua privacidade.

Você receberá uma cópia deste termo onde constam o telefone e endereço dos pesquisadores principais, podendo tirar dúvidas sobre o projeto e sua participação. Você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC pelo telefone (48) 3721-6094, e-mail [cep.propesq@contato.ufsc.br](mailto:cep.propesq@contato.ufsc.br) ou pessoalmente no seguinte endereço: rua Desembargador Vitor Lima, n. 222, 4º andar, sala 401. Trindade, CEP 88040-400- Florianópolis - SC.

Agradecemos a sua participação e colaboração.

**Consentimento em participar**

Eu, \_\_\_\_\_ fui esclarecido (a) sobre a pesquisa **AVALIAÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA DE PACIENTES COM ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA ATENDIDOS EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE REFERÊNCIA ESTADUAL** e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma. Estou ciente de que os dados poderão vir a ser usadas para fins científicos, aqui incluídas publicações e participações em congressos, nos limites da ética e do proceder científico e idôneo. Declaro que fui informado sobre todos os procedimentos da pesquisa e, que recebi de forma clara e objetiva todas as explicações pertinentes ao trabalho e, que todos os dados a meu respeito serão sigilosos. Eu compreendo que neste estudo, as medições dos experimentos/procedimentos de tratamento serão feitas em mim. Tive tempo para tomar a decisão, bem como chance de fazer questionamentos sobre o estudo. Minhas dúvidas foram esclarecidas.

Estou ciente de que posso interromper a participação no estudo a qualquer momento.

Nome do (a) paciente por extenso: \_\_\_\_\_

Assinatura do (a) participante: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**HOSPITAL UNIVERSITÁRIO/UFSC**

Campus Universitário - Trindade-Florianópolis - Santa Catarina – Brasil.

Pesquisadores Responsáveis:

Gisele Espíndola,

Rachel Schlindwein-Zanini,

Karen Fontes Luchesi,

Rosemeri Maurici da Silva,

Katia Lin

Alexandra Latini

Guilherme de Toledo e Silva

F. (48) 3721 6116, 3721 9134

## APÊNDICE B - Parecer Consubstanciado Do Cep

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA DE PACIENTES COM ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA ATENDIDOS EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE REFERÊNCIA ESTADUAL

**Pesquisador:** GISELE ESPINDOLA

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 74845217.6.0000.0121

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.908.752

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda como seguinte teor "Como mencionado no projeto de pesquisa principal com seres humanos intitulado AVALIAÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA DE PACIENTES COM ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA ATENDIDOS EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE REFERÊNCIA ESTADUAL, por mim coordenado, tendo como um dos objetivos principais o estudo longitudinal de aspectos clínicos, gerais e específicos, da ELA, venho solicitar uma emenda a este projeto, com a adição de um objetivo específico ao projeto original, que consistirá em realizar a quantificação das concentrações de intermediários metabólicos da via da tetraidrobiopterina (BH4), neopterina e sepiapterina, em amostras de plasma e urina, com o intuito de encontrar um biomarcador solúvel que prognostique a progressão da doença. Levando em consideração o aumento na incidência de diagnósticos de indivíduos acometidos por doenças neurodegenerativas, em particular a ELA, a necessidade de encontrar alternativas terapêuticas mais efetivas para as mesmas, e a necessidade de contar com biomarcadores quantitativos que permitam prognosticar o curso da doença, justifica-se a emenda deste trabalho no intuito de entender o papel do metabolismo da BH4 no processo neurodegenerativo da ELA. Se hipotetiza que baixas concentrações de BH4 possam ser identificadas precocemente em pacientes acometidos por ELA, antes dos sintomas clássicos serem instalados. A quantificação de BH4 em fluidos biológicos também poderá prever a progressão da doença. Caso isso seja demonstrado, este estudo permitirá abrir

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-400  
**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br



Continuação do Parecer: 3.908.752

novos horizontes terapêuticos, promovendo maior expectativa e qualidade de vida. Certa de sua atenção, Agradeço desde já, Atenciosamente, Gisele Espindola.

Portanto nesta emenda se avalia a inserção do objetivo específico: “realizar a quantificação das concentrações de intermediários metabólicos da via da tetraidrobiopterina (BH4), neopterina e sepiapterina, em amostras de plasma e urina, com o intuito de encontrar um biomarcador solúvel que prognostique a progressão da doença.”

Não houve solicitação de alteração do prazo de realização do projeto.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário: Já avaliado.

Objetivo Secundário: além dos já avaliados neste emenda solicita-se incluir: realizar a quantificação das concentrações de intermediários metabólicos da via da tetraidrobiopterina (BH4), neopterina e sepiapterina, em amostras de plasma e urina, com o intuito de encontrar um biomarcador solúvel que prognostique a progressão da doença.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Já avaliados.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Não se aplica.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Novo TCLE incluído contempla as exigências da resolução 466/12.

Foi introduzida nova autorização institucional do HU/UFSC/EBSERH.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Arprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401

**Bairro:** Trindade

**CEP:** 88.040-400

**UF:** SC

**Município:** FLORIANOPOLIS

**Telefone:** (48)3721-6094

**E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 3.908.752

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_103228_2_E1.pdf	08/02/2020 22:28:17		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_Ciencia_da_Instituicao_ELA.pdf	08/02/2020 22:26:47	GISELE ESPINDOLA	Aceito
Outros	resposta_ao_parecer_consultado_CEP_ELA_2020.docx	08/02/2020 22:20:37	GISELE ESPINDOLA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ELA_modificado_2019.docx	19/01/2020 16:43:38	GISELE ESPINDOLA	Aceito
Outros	respostapedenciasCEPescaneadoELA.pdf	19/10/2017 17:11:13	Karen Fontes Luchesi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_HU_ELA.pdf	16/10/2017 21:52:21	GISELE ESPINDOLA	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_ELA.pdf	16/10/2017 21:48:06	GISELE ESPINDOLA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_06102017.docx	06/10/2017 12:59:35	Karen Fontes Luchesi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_ELA_multiprofissional_06102017.doc	06/10/2017 12:58:44	Karen Fontes Luchesi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	decl_Ebserh_ELA.pdf	24/08/2017 15:17:59	Karen Fontes Luchesi	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

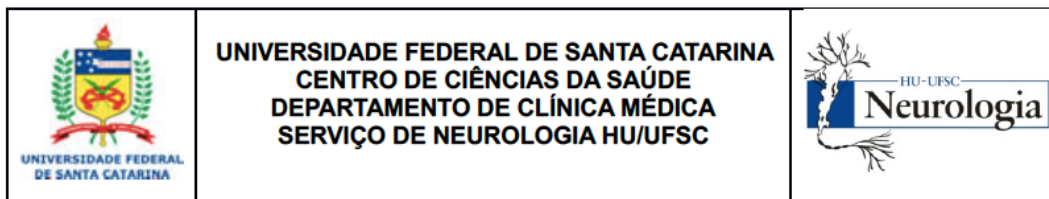
Não

FLORIANOPOLIS, 10 de Março de 2020

Assinado por:  
**Nelson Canzian da Silva**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-400  
**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

## APÊNDICE C - Questionário sobre o perfil clínico-epidemiológico dos pacientes do ambulatório de doenças neuromusculares



### QUESTIONÁRIO SOBRE O PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DOS PACIENTES DO AMBULATÓRIO DE DOENÇAS NEUROMUSCULARES

Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_ Número do prontuário: \_\_\_\_\_

Dados registrados por: \_\_\_\_\_

Nome completo: \_\_\_\_\_

Telefone: ( \_\_\_ \_\_\_ ) \_\_\_\_\_ / ( \_\_\_ \_\_\_ ) \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ anos Sexo: ( ) Masculino ( ) Feminino

Peso: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_ IMC: \_\_\_\_\_

Estado Civil: ( ) Casado (a) ( ) Solteiro (a) ( ) Viúvo (a) ( ) Divorciado (a) ( ) Relação Estável  
 Outro: \_\_\_\_\_

Cor referida do paciente: ( ) Branco ( ) Pardo ( ) Negro ( ) Amarelo ( ) Indígena

Escolaridade: \_\_\_\_\_ anos (Preencher até que série o paciente foi, em anos; por exemplo, se ele estudou até a 4ª série, mas repetiu a 4ª série 5 vezes, deve-se preencher 4 )

Profissão:

\_\_\_\_\_  
 (Se aposentado, desempregado ou diversas profissões, preencher com profissão predominante durante a vida e especificar a quanto tempo está aposentado e o motivo: invalidez, tempo de serviço, etc.)

Posse de itens

Quantidade de itens	0	1	2	3	4 ou +
Banheiro					
Empregados Domésticos*					
Automóveis					
Microcomputador (PC, notebook, netbook ou laptop. Não considerar tablets)					
Lava-louça					
Geladeira					
Freezer (aparelho independente ou parte de geladeira duplex)					
Lava-roupas					
DVD					
Micro-ondas					
Motocicleta					
Secadora de roupas (aparelho independente ou parte de máquina "lava e seca")					

\*considerar os empregados que trabalharem ao menos 5x/semana na casa: babás, faxineiras, motoristas, etc.

Grau de escolaridade do chefe de família:

Analfabeto / Fundamental 1 incompleto (1ª – 4ª série)

Fundamental 1 completo (1ª – 4ª série) / Fundamental 2 incompleto (5ª – 8ª série)

Fundamental 2 completo (5ª – 8ª série) / Ensino Médio incompleto  
 Ensino Médio completo / Ensino Superior incompleto  
 Ensino Superior completo

Água do domicílio proveniente de (marcar "X" na resposta)	
<input type="checkbox"/>	Rede de distribuição (CASAN, por exemplo)
<input type="checkbox"/>	Poço, nascente ou outro

Trecho da rua do domicílio (marcar "X" na resposta)	
<input type="checkbox"/>	Asfaltada ou pavimentada
<input type="checkbox"/>	Terra, cascalho ou outro (sem pavimento ou asfalto)

Comorbidades (descrever): \_\_\_\_\_

Uso de drogas (qual?): \_\_\_\_\_

MEDICAÇÕES E DOSAGENS SEGUNDO O PACIENTE/PRONTUÁRIO (Nome genérico, posologia diária em mg por dose, frequência de uso – ex.: 2x/dia, 3x/dia, etc.)

a- \_\_\_\_\_

b- \_\_\_\_\_

c- \_\_\_\_\_

Tabagista: \_\_\_\_\_ (anos-maço)

Etilista: (definido como consumir uma bebida alcoólica mais de duas vezes por semana por mais de 1 ano) ( ) Não ( ) Sim - quantidade: \_\_\_\_\_ Anos \_\_\_\_\_ Parou há: \_\_\_\_\_

#### Dados clínicos:

Data e Idade de início dos primeiros sintomas: --/--/----, \_\_\_\_\_ anos

Data do diagnóstico clínico (dd/mm/aaaa): \_\_\_\_\_

Atraso diagnóstico (definido como o tempo desde o início dos sintomas até o diagnóstico confirmado de ELA feito por um neurologista): \_\_\_\_\_ meses \_\_\_\_\_ anos

#### Classificação – local da apresentação inicial dos sintomas:

ELA de início bulbar ( ) ELA de início espinhal ( )

O primeiro sintoma iniciou-se no:

- Membro superior proximal (elevação do braço): ( ) direito ( ) esquerdo
- Membro superior distal (fraqueza mão): ( ) direito ( ) esquerdo
- Membro inferior: ( ) direito ( ) esquerdo
- Falta de ar ( )
- Dificuldades para engolir e engasgos ( )
- Dificuldade para articular palavras e fonação ( )
- Não possível determinar ( )

#### Categoria – características clínicas:

( ) ELA de início bulbar ( ) ELA de início espinhal cervical ( ) ELA de início espinhal lombar

( ) AMP (Atrofia muscular Progressiva) ( ) ELP (Esclerose lateral primária)

( ) Síndrome de Flail Leg ( ) Síndrome de Flail Arm ( ) ELA/DFT ( ) ELA extramidal-cerebelar

História familiar de ELA:

( ) Sim ( ) Não

Conceito de ELA familiar (parentes até segundo grau):

- Se sim, quem? ( ) Mãe ( ) Pai ( ) Irmãos ( ) Outros -----

Pais consanguíneos: ( ) Sim ( ) Não

Uso de riluzol (definida como tratamento duas vezes por dia durante mais de 2 semanas):  
( ) sim ( ) não. Se sim, quando (data):

Tratamento com edaravone: ( ) Sim ( ) Não. Se sim, quando (data):

**Gastrostomia:** ( ) Sim ( ) Não

Se sim - data do procedimento: \_\_/\_\_/\_\_ data da recusa: \_\_/\_\_/\_\_

**Ventilação não invasiva** (BIPAP fornecido, testado ou recusado): ( ) Sim ( ) Não

Se sim - data do início do uso \_\_/\_\_/\_\_

Se sim – tempo de uso noturna: ( ) <4h por dia ( ) 8-20 h ( ) > de 20h

**Traqueostomia:** ( ) Sim ( ) Não

Se Sim, data do procedimento: \_\_/\_\_/\_\_ Foi realizada: ( ) de urgência ( ) Eletiva/programada

Exames complementares:

RM CRÂNIO (DATA: \_\_/\_\_/\_\_)

( ) Não tem

---

RM COLUNA CERVICAL (DATA: \_\_/\_\_/\_\_)

( ) Não tem

---

ENMG (DATA: \_\_/\_\_/\_\_)

( ) Não tem

---

ENMG (DATA: \_\_/\_\_/\_\_)

( ) Não tem

---

ESPIROMETRIA (DATA: \_\_/\_\_/\_\_)

( ) Não tem

---

POLISSONOGRRAFIA (DATA: \_\_/\_\_/\_\_)

( ) Não tem

---

ESCALAS em anexo:

**Tabela 1 - Recomendações do consenso de Awaji-shima para a aplicação de testes eletrofisiológicos.<sup>3</sup>**

1 - Princípios (dos critérios de Airlie House) que o diagnóstico de esclerose lateral amiotrófica (ELA) requer:
(A) Presença de:
a) Evidência de degeneração do neurônio motor inferior (NMI) por exame clínico, eletrofisiológico ou neuropatológico;
b) Evidência de degeneração do neurônio motor superior (NMS) por exame clínico, eletrofisiológico ou neuropatológico;
c) Progressão dos sinais ou sintomas motores numa determinada região ou para outras, determinado pela história clínica, exame objetivo ou exames eletrofisiológicos.
(B) Ausência de:
a) Evidência eletrofisiológica ou patológica de outros processos patológicos que possam explicar os sinais de degeneração do NMI e/ou NMS; e
b) Evidência de neuroimagem de outros processos patológicos que possam explicar os sinais clínicos e eletrofisiológicos observados.
2. Categorias diagnósticas
<b>ELA clinicamente definitiva</b>
Evidência clínica ou eletrofisiológica de atingimento do NMS e NMI na região bulbar e em pelo menos duas regiões medulares; ou a presença de sinais de atingimento do NMS e do NMI em três regiões medulares.
<b>ELA clinicamente provável</b>
Evidência clínica ou eletrofisiológica de atingimento do NMS e NMI em pelo menos duas regiões com alguns sinais de atingimento do NMS necessariamente mais superiores aos do NMI.
<b>ELA clinicamente possível</b>
Evidência clínica ou eletrofisiológica de atingimento do NMS e NMI em apenas uma região; ou sinais de atingimento do NMS isolado em duas ou mais regiões; ou sinais de

**Escala de Estado de Saúde da ELA (ALSHSS)**

- ( ) *Estado I (leve)*: déficit é visto em apenas uma das três regiões (ou seja, fala, braço e perna) e o paciente é funcionalmente independente na fala, atividades de extremidade superior da vida diária e deambulação ;
- ( ) *Estado II (moderado)*: o déficit é visto em todas as três regiões ou déficit moderado a severo em uma região enquanto as outras duas regiões são normais ou ligeiramente afetadas;
- ( ) *Estado III (grave)*: o paciente necessita de assistência em duas ou três regiões: a fala é disártrica e / ou o paciente necessita de assistência para caminhar e / ou com atividades de extremidade superior da vida diária;
- ( ) *Estado IV (terminal)*: uso não-funcional de pelo menos duas regiões e uso moderado ou não funcional da terceira região.

## APÊNDICE D - Preparação, coleta e armazenamento das amostras de sangue

### POP COLETA de MATERIAL PROJETO ELA 2021

#### Projeto de pesquisa GEP 104/2017

**Sujeitos:**

Participantes com Esclerose Lateral Amiotrófica avaliados pela médica Gisele Espíndola no HUPEST/UFSC

**Local:**

Laboratório de análises clínicas – HU/UFSC e LABOX ([www.laboxufsc.com](http://www.laboxufsc.com))

**Amostras:** urina

**Demografia e clínica:** Coleta de todos os dados disponíveis de cada um dos participantes.

Coleta das amostras pela equipe de triagem do laboratório de análises clínicas

#### Tipo de material biológico e número de tubos e alíquotas

**Checklist geral**

- 1- Micropipeta automática com capacidade para pipetar 200 uL / 500 uL e/ou 1000 uL
- 2- Isopor com gelo triturado, ou bloquinho de blue ice
- 3- Centrífuga de tubo de coleta de sangue sem necessidade de ser refrigerada (500 x g)
- 4- Centrífuga refrigerada para tubo eppendorf (1,5 a 2 mL).  
Temperatura ideal: 4 °C; Capacidade da centrífuga: 10.000 x g (ideal)
- 5- Rack para manter os tubos erguidos para o processamento das amostras.
- 6- Gelo seco ou nitrogênio líquido para congelamento imediato das amostras (Ideal)
- 7- Freezer -70°C, -80°C ou -86°C
- 8- Tubos contendo EDTA (*vacutainer* tampa roxa) para a coleta de sangue.
- 9- Tubos contendo Citrato (*vacutainer* tampa azul-celeste) para a coleta de sangue.
- 10- *Shaker* para homogeneização de tubos contendo sangue.

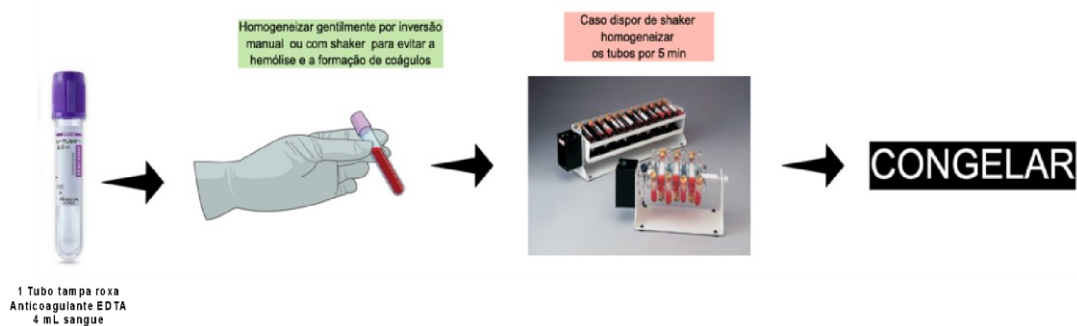


### Processamento do sangue

Tipo de material biológico: **SANGUE ANTICOAGULADO COM EDTA**

Detalhe: 1 tubo tampa roxa contendo EDTA

TOTAL tubos após processamento por cada participante: 1 tubo de coleta de sangue tampa roxa



Observações: A coleta não requer jejum

Mensurações: Epigenética, biopsia líquida para transcriptômica

#### Infraestrutura necessária:

- 1) Tubos coleta de sangue de 4 mL contendo EDTA (tampa roxa) e de tampa azul contendo citrato
- 2) *Shaker* para tubos de sangue (caso não tenha disponibilidade realizar inversão manual)
- 3) Rack para manter os tubos organizados
- 4) Rótulos para identificação dos tubos
- 5) Caixas de armazenamento a - 70 °C (- 80 ou - 86 °C)

### Processamento do plasma sem tratamento adicional

Tipo de material biológico: **PLASMA**

O plasma separado será alíquotado como segue:

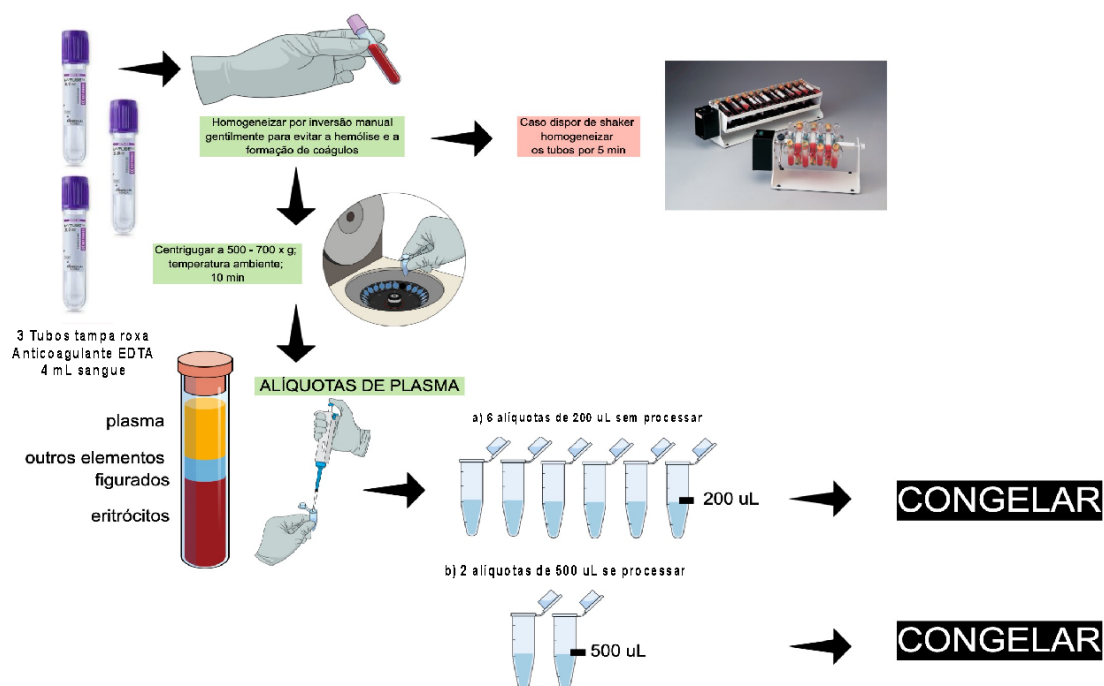
- a) 6 alíquotas de 200 uL em eppendorfs sem nenhum processamento
- b) 2 alíquotas de 500 uL sem nenhum processamento

TOTAL de tubos após processamento: 8 tubos eppendorf



Observações: A coleta não requer jejum

Mensurações: Perfil de pterinas e quinureninas, mediadores inflamatórios, lipídômica.



#### Infraestrutura necessária:

- 1) Tubos coleta de sangue de 4 mL contendo EDTA (tampa roxa)
- 2) *Shaker* para tubos de sangue (caso não ter disponibilidade realizar inversão manual)
- 3) Centrífuga de tubos de sangue (não precisa ser refrigerada)
- 4) Rack para manter os tubos organizados
- 5) Rótulos para identificação dos tubos
- 6) Pipeta automática e ponteiras para 200 uL
- 7) Caixas de armazenamento a - 70 °C (- 80 ou - 86 °C)
- 8) Caixa de isopor contendo gelo ou bloquinhos de blue ice para manter as amostras refrigeradas durante o processamento
- 9) Gelo seco ou nitrogênio líquido

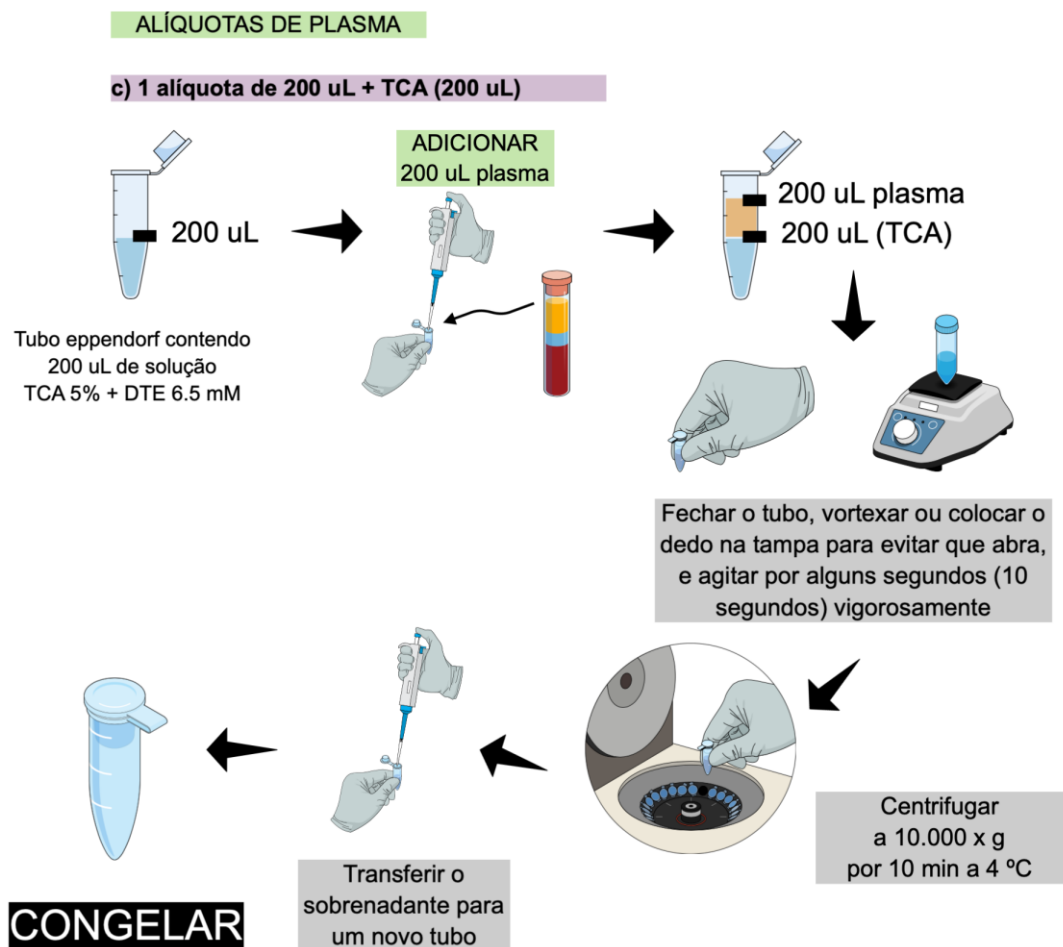
#### Processamento do plasma com tratamento com ácido (ácido tricloroacético; TCA)

Tipo de material biológico: **PLASMA**

Detalhes: 1 alíquota de 200 uL adicionada num tubo contendo ácido tricloroacético (TCA) 5 %. Homogeneizar vigorosamente, mas com cuidado para o tubo não abrir. Pode ser empregado vortex para realizar esta homogeneização. Centrifugar a 10.000 x g (se possível) a 4 °C e a seguir separar o sobrenadante e congelar.

TOTAL tubos após processamento: 1 tubo

Mensurações: Perfil de pterinas



#### Infraestrutura necessária:

- 1) Vórtex para homogeneizar os tubos eppendorf (caso não ter disponibilidade homogeneizar vigorosamente)
- 2) Rack para manter os tubos organizados
- 3) Rótulos para identificação dos tubos
- 4) Pipeta automática e ponteiros para 200 uL
- 5) Caixas de armazenamento a - 70 °C (- 80 ou - 86 °C)
- 6) Caixa de isopor contendo gelo ou bloquinhos de blue ice para manter as amostras refrigeradas durante o processamento
- 7) Gelo seco ou nitrogênio líquido

#### Processamento do plasma com tratamento com ácido (ácido tricloroacético; TCA + ditioeritritol; DTE)

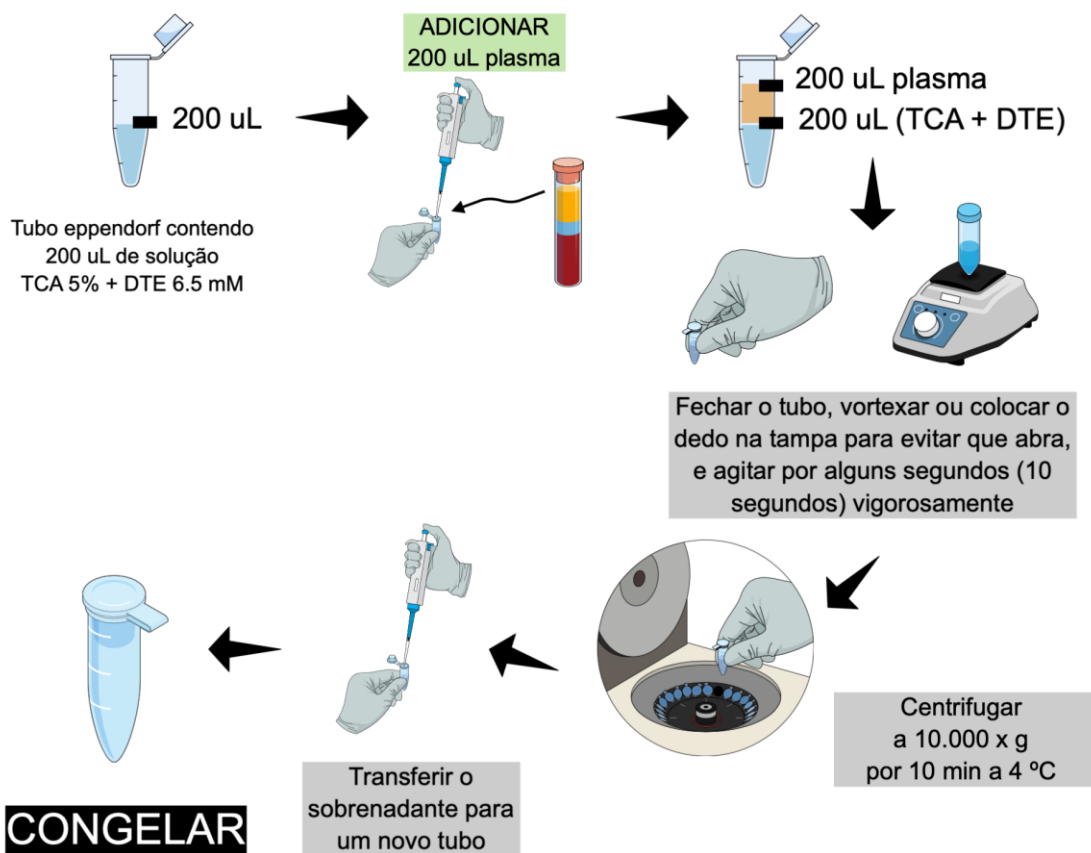
Tipo de material biológico: **PLASMA**

Detalhes: 1 alíquota de 200 uL adicionada num tubo contendo ácido tricloroacético (TCA) 5% e contendo ditioeritritol (DTE) 6,5 mM. Homogeneizar vigorosamente, mas com cuidado para o tubo não abrir. Pode ser empregado vortex para realizar esta homogeneização. Centrifugar a 10.000 x g (se possível) a 4 °C e a seguir separar o sobrenadante e congelar.

TOTAL tubos após processamento: 1 tubo

**ALÍQUOTAS DE PLASMA**

**c) 1 alíquota de 200 uL + TCA contendo DTE (200 uL)**



**Infraestrutura necessária:**

- 1) Vórtex para homogeneizar os tubos eppendorf (caso não ter disponibilidade homogeneizar vigorosamente)
- 2) Rack para mater os tubos organizados
- 3) Rótulos para identificação dos tubos
- 4) Pipeta automática e ponteiras para 200 uL
- 5) Caixas de armazenamento a - 70 °C (- 80 ou - 86 °C)
- 6) Caixa de isopor contendo gelo ou bloquinhos de blue ice para manter as amostras refrigeradas durante o processamento
- 7) Gelo seco ou nitrogênio líquido

## ANEXO A - Recomendações do consenso de Awaji-Shima para a aplicação de testes eletrofisiológicos

1 - Princípios (dos critérios de Airlie House) que o diagnóstico de esclerose lateral amiotrófica (ELA) requer:
(A) Presença de:
a) Evidência de degeneração do neurônio motor inferior (NMI) por exame clínico, eletrofisiológico ou neuropatológico;
b) Evidência de degeneração do neurônio motor superior (NMS) por exame clínico, eletrofisiológico ou neuropatológico;
c) Progressão dos sinais ou sintomas motores numa determinada região ou para outras, determinado pela história clínica, exame objetivo ou exames eletrofisiológicos.
(B) Ausência de:
a) Evidência eletrofisiológica ou patológica de outros processos patológicos que possam explicar os sinais de degeneração do NMI e/ou NMS; e
b) Evidência de neuroimagem de outros processos patológicos que possam explicar os sinais clínicos e eletrofisiológicos observados.
2. Categorias diagnósticas
<b>ELA clinicamente definitiva</b>
Evidência clínica ou eletrofisiológica de atingimento do NMS e NMI na região bulbar e em pelo menos duas regiões medulares; ou a presença de sinais de atingimento do NMS e do NMI em três regiões medulares.
<b>ELA clinicamente provável</b>
Evidência clínica ou eletrofisiológica de atingimento do NMS e NMI em pelo menos duas regiões com alguns sinais de atingimento do NMS necessariamente mais superiores aos do NMI.
<b>ELA clinicamente possível</b>
Evidência clínica ou eletrofisiológica de atingimento do NMS e NMI em apenas uma região; ou sinais de atingimento do NMS isolado em duas ou mais regiões; ou sinais de atingimento do NMI mais superiores aos do NMS.
<b>Legenda:</b> Estudos clínicos laboratoriais e de neuroimagem, devem ter sido realizados e outras patologias excluídas.

Fonte: CARVALHO, 2008.

**ANEXO B - Escala de Estado de Saúde da ELA (ALSHSS)**

- ( ) **Estado I (leve):** déficit é visto em apenas uma das três regiões (ou seja, fala, braço e perna) e o paciente é funcionalmente independente na fala, atividades de extremidade superior da vida diária e deambulação ;
- ( ) **Estado II (moderado):** o déficit é visto em todas as três regiões ou déficit moderado a severo em uma região enquanto as outras duas regiões são normais ou ligeiramente afetadas;
- ( ) **Estado III (grave):** o paciente necessita de assistência em duas ou três regiões: a fala é disártrica e / ou o paciente necessita de assistência para caminhar e / ou com atividades de extremidade superior da vida diária;
- ( ) **Estado IV (terminal):** uso não-funcional de pelo menos duas regiões e uso moderado ou não funcional da terceira região.

Fonte: RIVIERE *et al.*, 1998.

## ANEXO C - Escala de avaliação funcional da ELA (ALSFRS-R)

<b>The ALS Functional Rating Scale - Revised (ALSFRS-R/BR)</b>	
<b>Fala</b>	
Processo da fala normal	4
Distúrbio da fala detectável	3
Compreensível com repetição	2
Fala combinada com comunicação não-vocal	1
Perda da utilidade da fala	0
<b>Salivação</b>	
Normal	4
Insignificante, mas notável o excesso de saliva na boca podendo ter babas noturnas	3
Excesso de saliva moderada, podendo ter mínimas babas	2
Excesso acentuado de saliva com alguma baba	1
Baba acentuada exigindo constante uso de babador ou lenço para boca	0
<b>Deglutição</b>	
Normal	4
Problemas precoces para comer, engasgos ocasionais	3
Alteração na consistência da dieta	2
Necessidade de suplemento alimentar pastoso	1
Nada pela boca, exclusivamente parenteral ou enteral	0
<b>Escrita</b>	
Normal	4
Lentificada ou descuidada, todas as palavras são legíveis	3
Nem todas as palavras são legíveis	2
Capaz de segurar a caneta, mas incapaz de escrever	1
Não é capaz de segurar a caneta	0
<b>Manipulação de alimentos e utensílios (Indivíduos sem gastrostomia)</b>	
Normal	4
Um pouco lento e desajeitado, mas não necessita de ajuda	3
Pode cortar o alimento embora lento e desajeitado; necessita de alguma ajuda	2
Alimentos cortados por outra pessoa, mas alimenta-se sozinho lentamente	1
Precisa ser alimentado	0
<b>(Indivíduos com gastrostomia)</b>	
Normal	4
Desajeitado, mas capaz de desempenhar todas as manipulações	3
Alguma ajuda necessária com tampas e fechos	2
Oferece assistência mínima ao cuidador	1
Incapaz de executar qualquer aspecto da tarefa	0
<b>Vestuário e Higiene</b>	
Normal	4
Independente de auto-cuidado com diminuição do rendimento do esforço	3

Assistência intermitente ou substituição dos métodos	2
Necessita do cuidador para auto-cuidado	1
Dependência total	0
<b>Virar na cama e ajustar a roupa de cama</b>	
Normal	4
Um pouco lento ou desajeitado, não necessita de ajuda	3
Pode virar sozinho ou ajustar o lençol com grande dificuldade	2
Tem iniciativa, não consegue virar ou ajustar o lençol sozinho	1
Incapaz	0
<b>Andar</b>	
Normal	4
Deambulação precoce dificultada	3
Passeios com assistência	2
Movimento funcional não-deambulatório somente	1
Não apresenta movimentação voluntária das pernas	0
<b>Subir escadas</b>	
Normal	4
Lentidão	3
Ligeiro desequilíbrio ou fadiga	2
Necessita de assistência	1
Não realiza	0
<b>Dispnéia</b>	
Nenhuma	4
Ocorre quando caminha	3
Ocorre quando come, toma banho e se veste	2
Ocorre no repouso, ou sentado ou deitado	1
Dificuldade significativa, considerando suporte mecânico	0
<b>Ortopnéia</b>	
Nenhuma	4
Alguma dificuldade de dormir, falta de ar, não se utiliza rotineiramente mais que 2 travesseiros	3
Necessita de travesseiros extras para dormir (mais que 2)	2
Pode dormir somente sentado	1
Não consegue dormir	0
<b>Insuficiência respiratória</b>	
Nenhuma	4
Uso intermitente do BIPAP	3
Uso contínuo do BIPAP à noite	2
Uso contínuo do BIPAP durante o dia e a noite	1
Ventilação mecânica invasiva por intubação	0

Fonte: GUEDES *et al.*, 2010.

## ANEXO D - Questionário de avaliação de qualidade de vida da ELA (ALSAQ-40/BR)

### QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO DE ELA

- Completar este questionário assim que possível: se você não tem nenhuma dificuldade em preencher o questionário por si só, peça a alguém para ajudá-lo. De qualquer forma estamos interessados em suas respostas.
  - O questionário consiste de um número de relatos sobre dificuldades que você pode ter sentido durante as 2 últimas semanas. Não há respostas certas ou erradas, sua primeira resposta é provavelmente a mais precisa para você. Sinalize o quadro que melhor descreve sua própria experiência ou sentimentos.
  - Tentar responder as questões mesmo que algumas pareçam ser particularmente semelhantes a outras, ou podem não parecer relevante a você.
  - Todas as informações que você dar serão tratadas com sigilo total, e é completamente anônima. Não há caminho de identificá-lo através do questionário.
- Os seguintes enunciados referem a dificuldades que você pode ter tido durante as 2 últimas semanas. Indicar, assinalando o quadro apropriado, com que frequência os seguintes enunciados tem sido verdadeiros a você.

Com que frequência os seguintes enunciados tem sido verdadeiros a você?	N	R	A	F	S
1. Tenho encontrado dificuldade para caminhar curtas distâncias, isto é, em volta da casa.	0	1	2	3	4
2. Tenho caído enquanto ando.					
3. Tenho tropeçado enquanto caminho.					
4. Tenho perdido meu equilíbrio enquanto caminho.					
5. Tenho tido que prestar atenção enquanto caminho.					
6. Caminhar tem me fadigado completamente.					
7. Tenho tido dores em minhas pernas enquanto caminho.					
8. Tenho encontrado dificuldade em subir e descer degraus.					
9. Tenho encontrado dificuldade para ficar em pé.					
10. Tenho encontrado dificuldade para levantar-me de cadeiras.					
11. Tenho encontrado dificuldade em utilizar meus braços.					
12. Tenho encontrado dificuldade em virar e movimentar-me na cama.					
13. Tenho encontrado dificuldade em pegar pequenos objetos.					
14. Tenho encontrado dificuldade em manter livros ou jornais, ou virar páginas.					
15. Tenho encontrado dificuldade em escrever claramente.					
16. Tenho encontrado dificuldade em fazer trabalhos de casa.					
17. Tenho encontrado dificuldade para alimentar-me sozinho.					
18. Tenho encontrado dificuldade em escovar meus cabelos ou escovar os dentes.					
19. Tenho encontrado dificuldade em vestir-me.					
20. Tenho encontrado dificuldade em lavar a mão na pia.					
21. Tenho encontrado dificuldade em engolir.					
22. Tenho tido dificuldade em mastigar comidas sólidas.					
23. Tenho encontrado dificuldade em beber líquidos.					
24. Tenho encontrado dificuldade em participar de conversas pela dificuldade na fala.					
25. Tenho sentido que as pessoas não compreendem o que eu falo.					
26. Tenho tido dificuldade em falar algumas palavras ou letras.					
27. Tenho tido que falar muito devagar.					
28. Tenho falado menos que de costume pela dificuldade na fala.					
29. Tenho estado incomodado com minha fala.					
30. Tenho consciência sobre as dificuldades da minha fala.					
31. Tenho sentido solitário.					
32. Tenho estado aborrecido.					
33. Tenho sentido envergonhado em situações sociais.					
34. Tenho estado sem esperanças em relação ao futuro.					
35. Tenho sentido preocupado em depender dos outros.					
36. Tenho refletido porque continuo lutando.					
37. Tenho dificuldades em aceitar a doença.					
38. Tenho estado deprimido.					
39. Tenho preocupações com o futuro.					
40. Eu tenho sentido dependente nas AVDs.					

N Nunca R raramente A às vezes F Frequentemente S Sempre

Fonte: Pavan *et al.*, 2007.



## ANEXO E - Escala de Sonolência de Epworth

Nome: \_\_\_\_\_  
 Data: \_\_\_\_\_ Idade (anos): \_\_\_\_\_  
 Sexo: \_\_\_\_\_

Qual a probabilidade de você cochilar ou dormir, e não apenas se sentir cansado, nas seguintes situações? Considere o modo de vida que você tem levado recentemente. Mesmo que você não tenha feito algumas destas coisas recentemente, tente imaginar como elas o afetariam. Escolha o número mais apropriado para responder cada questão:

0 = nunca cochilaria  
 1 = pequena probabilidade de cochilar  
 2 = média probabilidade de cochilar  
 3 = grande probabilidade de cochilar

Situação	Probabilidade de cochilar			
	0	1	2	3
Sentado e lendo	0	1	2	3
Assistindo TV	0	1	2	3
Sentado, quieto, em um lugar público (por exemplo, em um teatro, reunião ou palestra)	0	1	2	3
Andando de carro por uma hora sem parar, como passageiro	0	1	2	3
Ao deitar-se à tarde para descansar, quando possível	0	1	2	3
Sentado conversando com alguém	0	1	2	3
Sentado quieto após o almoço sem bebida de álcool	0	1	2	3
Em um carro parado no trânsito por alguns minutos	0	1	2	3

Obrigado por sua cooperação

Fonte: Bertolazi *et al.*, 2009;

## ANEXO F – Mechanized food-frequency questionnaire (MFFQ)

### Mechanized food-frequency questionnaire (MFFQ)

(pesquisa de dieta recente e de longo prazo)

Notas:

- Use todas as quatro perguntas apenas uma vez, durante a primeira entrevista
- Use as perguntas 2 a 4 para atualizações semanais ou mensais para estudos longitudinais

1. Você seguiu alguma dessas dietas (marque todas as que se aplicam)?

Dieta	Último mês	Últimos 5 anos
a. Onívoro		
b. Vegano (nada origem animal)		
c. Vegetariano (pode laticínios)		
d. Pescatariano (vegetariano + frutos mar)		
e. Ovo-vegano		
f. Paleo (carne, frutos e sementes)		
g. Paleo autoimune (AIP) (restrição de ovos, nozes, sementes e nightshades (tomate, batata, pimentões, etc))		
h. Dieta dos 30 dias (restritiva/paleo)		
i. Cetogênica (alta proteína)		
j. Cetogênica (alto teor de gordura)		
k. Mediterrâneo		
l. Dieta MIND (Intervenção Mediterrânea-Dash para atraso Neurodegenerativo)		
m. Baixo teor de carboidratos (low carb)		
n. FODMAP baixo (carboidratos altamente fermentativos)		
o. Dieta de eliminação		
p. Nenhuma das acima		
q. Campo de texto livre		

2. Liste os alimentos que você evitou: \_\_\_\_\_

3. Com que frequência você come esses tipos de alimentos:

Alimento	Frequência		
	Nunca	1-3 x/semana	Mais de 3 x/semana
a. Carne vermelha (inclui carne de porco)			
b. Aves			
c. Peixe			
d. Laticínios			
e. Pelo menos uma porção de vegetais			

4. Com que frequência você consumiu:

Alimento	Frequência		
	Nunca	1 a 3 x/semana	Mais de 3 x/semana
a. Frutas			
b. Fast food			
c. Sobremesa ou lanches doces			
d. Bebidas doces (refrigerante, suco)			
e. Alimentos fritos			
f. Bebidas alcoólicas			