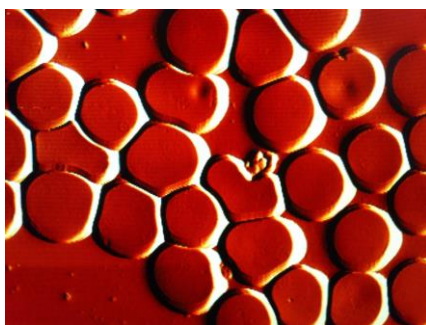


**UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA**



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



Biomarcadores respiratórios na abordagem clínica da Esclerose Lateral Amiotrófica

Ana Catarina de Oliveira da Silva Pronto Laborinho

Orientador: Professor Doutor Mamede Alves de Carvalho

Co-Orientador: Professora Doutora Filomena Maria Dias de Almeida Carvalho

Tese especialmente elaborada para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biomédicas, especialidade de Fisiologia.

2020

UNIVERSIDADE DE LISBOA FACULDADE DE MEDICINA



Biomarcadores respiratórios na abordagem clínica da Esclerose Lateral Amiotrófica

Ana Catarina de Oliveira da Silva Pronto Laborinho

Orientador: Professor Doutor Mamede Alves de Carvalho

Co-Orientador: Professora Doutora Filomena Maria Dias de Almeida Carvalho

Tese especialmente elaborada para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biomédicas, especialidade de Fisiologia.

Júri:

Presidente: Professor Doutor João Eurico Cortez Cabral da Fonseca, Professor Catedrático e Vice-Presidente do Conselho Científico da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Vogais:

Professora Doutora Raquel Maria Fino Seiça, Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Professor Doutor João Carlos Winck Fernandes Cruz, Professor Associado Convidado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Professor Doutor Mamede Alves de Carvalho, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Professor Doutor Alexandre Valério de Mendonça, Professor Catedrático Convidado da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Professora Doutora Maria Cristina de Brito Eusébio Bárbara Prista Caetano, Professora Associada Convidada da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Professora Doutora Vera Lúcia Poço Geraldes, Professora Auxiliar Convidada da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Instituição Financiadora: ONWebDUALS (JPND-PS/0001/2013)

2020



anapronto@medicina.ulisboa.pt

Declaro que o trabalho nesta dissertação foi realizado de acordo com o Regulamento da Universidade de Lisboa. O trabalho é original, excepto quando indicado por referência especial no texto, e nenhuma parte da dissertação foi submetida para qualquer outro prémio académico.

As opiniões expressas nesta publicação são da exclusiva responsabilidade do seu autor.

A impressão desta tese foi aprovada pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de 22 de outubro de 2019.

Às minhas filhas, Rita e Marta

Em memória do meu pai, Carlos Francisco Pronto

“Não sei o que nos espera, mas sei o que me preocupa: é que a medicina, empolgada pela ciência, seduzida pela tecnologia e atordoada pela burocracia, apague a sua face humana e ignore a individualidade única de cada pessoa que sofre, pois embora se inventem cada vez mais modos de tratar, não se descobriu ainda a forma de aliviar o sofrimento sem empatia ou compaixão.”

João Lobo Antunes *in* "A Nova Medicina"

ÍNDICE

PREFÁCIO.....	xiv
AGRADECIMENTOS.....	xviii
LISTA DE ABREVIATURAS	xxiii
RESUMO.....	xxxiv
ABSTRACT.....	xxxiv
CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Introdução.....	2
1.2. Esclerose lateral amiotrófica (ELA)	6
1.3. Factores de risco para a Esclerose Lateral Amiotrófica.....	18
1.4. Mecanismos patogénicos na ELA	38
CAPÍTULO 2 - BIOMARCADORES MOLECULARES NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA.....	49
2.1. Biomarcadores na Esclerose Lateral Amiotrófica	50
2.2. A insuficiência respiratória na Esclerose Lateral Amiotrófica.....	89
2.3. Potenciais biomarcadores moleculares de insuficiência respiratória na Esclerose Lateral Amiotrófica	94
2.4. O eritrócito: estrutura e biologia.....	100
2.5. Objectivos da tese	102
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	103
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO DE RESULTADOS	134
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	184
BIBLIOGRAFIA.....	190
ANEXOS.....	240
Artigo 1.....	241
Plasma level of club-cell (CC-16) predicts outcome in amyotrophic lateral sclerosis ..	241
Artigo 2.....	247
Interleukin-6 and amyotrophic lateral sclerosis	247

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Geometria dos eritrócitos.	5
Figura 2 Jean-Martin Charcot.....	6
Figura 3 O Sistema Motor.	8
Figura 4 Manifestações clínicas da ELA.....	11
Figura 5 Fenótipo e Sobrevida na Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA).....	12
Figura 6 Padrão de envolvimento motor em diferentes fenótipos de ELA.....	13
Figura 7 Interações entre genes associados à Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA).	26
Figura 8 Frequência de genes na ELA.....	27
Figura 9 Esclerose lateral amiotrófica e demência fronto-temporal.....	30
Figura 10 Mutações <i>C9orf72</i> : três patomecanismos propostos.	31
Figura 11 Fisiopatologia da ELA.	40
Figura 12 Neurodegeneração autónoma celular e não-celular na ELA.....	46
Figura 13 Sistemas de Estadiamento da ELA.	53
Figura 14 As principais anomalias respiratórias que se desenvolvem na ELA....	90
Figura 15 Moléculas de fibrinogénio.....	99
Figura 16 Composição da membrana eritrocitária: bicamada lipídica, proteínas transmembranares e rede filamentosa de proteínas, formando um esqueleto de membrana.	101
Figura 17 Componentes principais de um microscópio de força atómica e respectivo modo de operação.	105
Figura 18 Modos diferentes no AFM para diferentes aplicações.....	107
Figura 19 Variações na rigidez dos tecidos.....	109
Figura20 Ilustração esquemática do princípio experimental para ensaio imunoenzimático (ELISA) e ensaios multiplex baseados em esferas.	113
Figura 21 Representação esquemática de um procedimento de ensaio baseado em imunensaio de sanduíche.....	114
Figura 22 Tecnologia de imunensaio multiplex.	115
Figura 23 Representação esquemática do potencial zeta.....	119

Figura 24 Gráfico dos resultados. Distribuição dos valores plasmáticos de CC-16 após quantificação, por ELISA, de pacientes com ELA e de controlos.	136
Figura 26 Gráfico de <i>Kaplan-Meier</i> demonstra que níveis elevados de CC-16 são um indicador prognóstico de exigência de ventilação não-invasiva nos 6 meses seguintes.....	138
Figura 27 Curvas de sobrevida de acordo com a concentração de CC-16.	139
Figura 28 Comparação entre os níveis de IL-6 em controlos e pacientes com ELA.	141
Figura 29 Correlação entre o <i>Phrenic Ampl</i> e os níveis de IL-6.	142
Figura 30 Representação gráfica da curva de sobrevida obtida pela regressão Cox com base na média das co-variáveis (preditoras de sobrevida).....	151
Figura 31 Gráfico comparativo entre grupos dos níveis plasmáticos do fibrinogénio γ'	154
Figura 32 Propriedades morfológicas dos eritrócitos, medidas por microscopia de força atómica em pacientes de ELA e controlos.	157
Figura 33 Propriedades morfológicas dos eritrócitos.....	159
Figura 34 Rugosidade da superfície da membrana dos eritrócitos.	160
Figura 35 Estudo do alongamento dos eritrócitos.	160
Figura 36 Estudo de elasticidade eritrocitária medidos por AFM para o grupo controlo e pacientes com ELA.....	162
Figura 37 Medidas de potencial zeta em eritrócitos.	164
Figura 38 Estudo de agregação dos eritrócitos de amostras de pacientes de ELA (n=86) e grupo controlo	165
Figura 39 Estudo de parâmetros hemorreológicos de pacientes de ELA e grupo controlo	166
Figura 40 Estudo da viscosidade sanguínea em pacientes de ELA e grupo controlo.	168
Figura 41 Estudo dos parâmetros eritrocitários obtidos por hemograma, para o grupo controlo e pacientes com ELA.....	173
Figura 42 Resumo das prespectivas futuras e os principais estudos e metodologias propostas para aplicação futura.	189

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Critérios do <i>El Escorial</i> , <i>Airlie House</i> (<i>El Escorial</i> revisto) e de <i>Awaji-Shima</i> para o diagnóstico de ELA	14
Tabela 2 Visão geral das principais informações disponíveis para ELA e <i>loci</i> FTDALS.....	21
Tabela 3 As características ideais para biomarcadores na esclerose lateral amiotrófica (ELA).....	51
Tabela 4 MicroRNAs (<i>miRNAs</i>) expressos diferencialmente no líquido cefalorraquidiano (LCR), soro e plasma.....	60
Tabela 5 Mediadores inflamatórios detectados no LCR de pacientes com esclerose lateral amiotrófica (ELA).....	64
Tabela 6 Biomarcadores endócrinos estudados na saliva na esclerose lateral amiotrófica (ELA).....	79
Tabela 7 Os cinco biomarcadores de diagnóstico mais investigados na ELA....	80
Tabela 8 Resumo dos principais biomarcadores em fluidos corporais.....	82
Tabela 9 Classificação de potenciais biomarcadores antropométricos na esclerose lateral amiotrófica (ELA).....	87
Tabela 10 Resumo das técnicas utilizadas e respectivos parâmetros analisados	122
Tabela 11 Resumo dos resultados da quantificação da CC-16 no plasma de pacientes com ELA e no grupo controlo.....	135
Tabela 12 Análise descritiva dos valores da IL-6 plasmática para as diferentes variáveis nos diferentes subtipos da amostra.....	141
Tabela 13 Características demográficas dos doentes da amostra, relativamente ao género, fenótipo e presença de demência fronto-temporal (FTD).....	144
Tabela 14 Análise descritiva das variáveis: idade de diagnóstico (anos) e duração da doença na consulta inicial (meses).	145
Tabela 15 Análise descritiva das várias avaliações na primeira consulta, <i>t1</i>	146
Tabela 16 Análise descritiva das várias variáveis, na primeira consulta (<i>t1</i>), de pacientes com valores de creatinina inferiores ao limite inferior determinado pelo laboratório.	147

Tabela 17 A tabela representa a influência das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes, na primeira consulta, <i>t1</i> , expresso sob a forma de um coeficiente de regressão.	148
Tabela 18 Avaliação longitudinal da influência das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes, até uma terceira avaliação, no decurso da doença, expresso sob a forma de um coeficiente de regressão.	149
Tabela 19 Representação da análise da mortalidade dos pacientes da amostra, através da regressão de Cox, tendo em conta a influência das várias co-variáveis (preditoras de sobrevida).	150
Tabela 20 Propriedades morfológicas dos eritrócitos no grupo de doentes e no grupo controlo.	158
Tabela 21 Análise descritiva da deformabilidade eritrocitária.....	166
Tabela 22 Análise descritiva da viscosidade sanguínea, em amostras de pacientes com ELA e controlos.	167
Tabela 23 Análise descritiva dos parâmetros hematológicos determinados no hemograma.	170

PREFÁCIO

Nota aos leitores,

O trabalho apresentado nesta tese resulta da pesquisa realizada durante os meus estudos de doutoramento, possibilitada pela Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa (FMUL). Este projecto foi desenvolvido entre 2015 e 2019 e foi uma grande honra para mim pertencer ao Programa de Doutoral do Centro Académico de Medicina de Lisboa (CAML), partilhado entre o Instituto de Medicina Molecular-João Lobo Antunes (iMM, Lisboa, Portugal), Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa (FMUL, Lisboa, Portugal) e Centro Hospitalar Universitário Lisboa Norte (CHULN, Lisboa, Portugal). Tenho o prazer de fazer parte do Instituto de Fisiologia da FMUL e da Equipa do Professor Doutor Mamede de Carvalho, onde a maior parte deste trabalho de Tese de Doutoramento teve lugar, sob a supervisão do Professor Doutor Mamede de Carvalho e a co-orientação da Professora Doutora Filomena Carvalho. Parte deste trabalho também foi realizado no Grupo do Professor Doutor Nuno Santos, Instituto de Bioquímica e Laboratório Nuno Santos (iMM-João Lobo Antunes). Os trabalhos desenvolvidos para esta tese, desde 2015, constituem uma linha fundamental de investigação que decorre na Unidade do iMM do Professor Doutor Mamede de Carvalho. Neste seguimento, tive a oportunidade de efectuar uma proposta de colaboração ao Professor Doutor Nuno Santos e à Professora Doutora Filomena Carvalho, de forma a explorar novas possibilidades, tendo em conta o conhecimento e experiência destes investigadores em métodos tecnológicos recentes que permitiu avanços originais.

Entrei na Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa em 2004, desde quando tenho trabalhado com diferentes técnicas, tendo sido uma experiência enriquecedora o aprender de novas metodologias. Ao ter contacto, com a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), em particular dos pacientes que dela sofrem, tive a certeza que seria uma área na qual deveria contribuir, sabendo que os mecanismos subjacentes a esta doença não são, ainda, totalmente compreendidos. Tal

encorajou-me a trabalhar arduamente, como um desafio para dar um pequeno contributo no encontrar de meios para tratar tal devastadora doença.

Dois artigos já publicados resumem parte dos trabalhos obtidos:

- Pronto-Laborinho, A. C., Gromicho, M., Pereira, M., Pinto, S., Barros, M. D. A., Swash, M., & de Carvalho, M. (2018). Plasma level of club-cell (CC-16) predicts outcome in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica*, 137(2), 233-237. (JIF:3,087; Q1, H-index 87).
- Pronto-Laborinho, A., Pinto, S., Gromicho, M., Pereira, M., Swash, M., & de Carvalho, M. (2019). Interleukin-6 and amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the neurological sciences*, 398, 50-53.(JIF:2,651; Q2, H-index 124).

Muitas comunicações apresentadas, em geral em congressos internacionais, partilham estes e outros resultados, que ainda estão em fase de preparação para posterior submissão, na forma de artigos. Na verdade, tive o privilégio de participar em várias conferências científicas internacionais e nacionais, e estes resultados permitiram dois prémios para a melhor comunicação oral (Prémio Novartis, do XXII Congresso de Pneumologia do Norte, 2015; Prémio Boehringer Ingelheim, do 8º Congresso de Pneumologia do Centro, 2017), e ser finalista para o prémio do melhor “poster” (no Congresso, “*International Symposium on ALS/MND, Glasgow, 2018*).

Esta tese é constituída por vários capítulos, e outras secções complementares.

Nos Capítulos I e II, faz-se uma revisão organizada da literatura sobre a ELA, incluindo contextualização histórica, conceitos fisiopatológicos e uma revisão do estado da arte dos biomarcadores moleculares na ELA. Faz-se, igualmente, uma breve revisão aos potenciais biomarcadores estudados no âmbito da tese, em particular em relação com a disfunção respiratória na ELA, que introduzirá o leitor no tema e o conduzirá aos objectivos principais.

No Capítulo III, descrevem-se os métodos associados a cada um dos trabalhos, neste capítulo, estão, ainda, descritos os objectivos principais de cada estudo.

No Capítulo IV, apresentam-se os principais resultados de cada trabalho experimental, bem como uma breve discussão dos mesmos.

No Capítulo V, discute-se a novidade e eventual importância do nosso contributo, escreve-se os comentários finais e as perspectivas futuras.

Adicionalmente, são apresentadas nas primeiras páginas a dedicatória, agradecimentos, autoria, índices de figuras e tabelas, lista de abreviaturas e o resumo da tese, tanto em português como em inglês.

Paralelamente, aos estudos que integraram a tese, colaborei em outros trabalhos, fora do âmbito estrito da tese, e que resultaram nos seguintes artigos científicos publicados pelo nosso grupo:

- Costa, M. R., Gromicho, M., **Pronto-Laborinho, A. C.**, Miltenberger, M. G., & de Carvalho, M. (2019). Novel TBK1 LoF variant in a family with upper motor neuron predominant motor neuron disease. *Journal of the neurological sciences*, 403, 117. (JIF:2,651; Q2, H-index 124).
- Costa, J., Streich, L., Pinto, S., **Pronto-Laborinho, A.**, Nimtz, M., Conradt, H. S., & de Carvalho, M. (2019). Exploring Cerebrospinal Fluid IgG N-Glycosylation as Potential Biomarker for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Molecular neurobiology*, 1-11. (JIF:5,076; Q1, H-index 96).
- Gromicho, M., Pinto, S., Gisca, E., **Pronto-Laborinho, A. C.**, & de Carvalho, M. (2018). Frequency of C9orf72 hexanucleotide repeat expansion and SOD1 mutations in Portuguese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Aging*. (JIF:2,35; Q1, H-index 168).
- Miltenberger-Miltenyi, G., Conceição, V. A., Gromicho, M., **Pronto-Laborinho, A. C.**, Pinto, S., & de Carvalho, M. (2018). C9orf72 expansion is associated with accelerated decline of respiratory function and decreased survival in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, jnnp-2018. (JIF:7,144; Q1, H-index 188).
- Gromicho, M., Oliveira Santos, M., Pinto, A., **Pronto-Laborinho, A.**, & De Carvalho, M. (2017). Young-onset rapidly progressive ALS associated with heterozygous FUS mutation. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 1-3. (JIF:2,883; Q1, H-index 66).
- Santos, M. O., Caldeira, I., Gromicho, M., **Pronto-Laborinho, A.**, & de Carvalho, M. (2017). Brain white matter demyelinating lesions and amyotrophic

lateral sclerosis in a patient with C9orf72 hexanucleotide repeat expansion. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 17, 1-4. (JIF:2,725; Q1, H-index 25).

- Duarte, C., Pinto, S., Napoleão, P., **Pronto-Laborinho, A. C.**, Barros, M. A., Freitas, T., ... & Saldanha, C. (2016). "Identification of erythrocyte biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical hemorheology and microcirculation*", 1-15. (JIF:1,642; Q3, H-index 48).
- Gonçalves, M., De Carvalho, M., Peixoto, C., Alves, P., Barreto, C., Oliva, A., Pinto S., **Pronto-Laborinho AC**, Gormicho M. & Costa, J. (2016). Phosphoneurofilament heavy chain and vascular endothelial growth factor as cerebrospinal fluid biomarkers for ALS. *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration*, 1. (JIF: 2,883; Q1, H-index 66).
- **Pronto-Laborinho, A. C.**, Pinto, S., & de Carvalho, M. (2014). Review article: "Roles of Vascular Endothelial Growth Factor in Amyotrophic Lateral Sclerosis". *BioMed Research International*, 2014. (JIF:2,583; Q2, H-index 94).
Artigo publicado em "Special Issue"Decoding Amyotrophic Lateral Sclerosis: Discovery of Novel Disease-Related Biomarkers and Future Perspectives in Neurodegeneration"

A doutoranda beneficiou da Bolsa de Doutoramento (Isenção de Propinas) no âmbito do Programa de Apoio Financeiro à Formação Académica do Pessoal Não Docente da FMUL (atribuída nos anos lectivos 2015/2016 a 2018/2019).

Embora este projecto tenha ganho, através de concurso, a Bolsa de Doutoramento da Universidade de Lisboa, a doutoranda não pôde usufruir da mesma devido a uma incompatibilidade entre o regime de dedicação exclusiva, exigido pela Universidade de Lisboa, e a situação profissional, pelo que a bolsa foi abdicada.

Este projecto e os estudos incluídos tiveram a aprovação da Comissão de Ética do CAML, sendo que todos os dados clínicos foram sujeitos à confidencialidade, cumprindo o regulamento geral da protecção de dados (25/05/2018).

Esta tese está escrita sem seguir o novo acordo ortográfico.

AGRADECIMENTOS

Na realização de um trabalho desta índole, há sempre algumas pessoas que contribuem directa ou indirectamente para a sua concretização. Por isso, quero deixar algumas palavras de agradecimento sincero, ainda que muito pequeno em comparação com a grandeza do contributo que recebi.

Primeiramente, eu gostaria de agradecer e reconhecer as pessoas com ELA, e suas famílias, que concordaram em colaborar nos nossos estudos. Eu também gostaria de agradecer aos voluntários saudáveis que aceitaram ser controlos nos estudos que compõem a tese.

Agradeço a todos amigos e colegas que me deram encorajamento, sendo que a crença depositada em mim, foram importantes para cumprir os meus objectivos.

Quero agradecer a oportunidade que me foi dada pelo Professor Doutor Mamede de Carvalho para a realização desta tese, na senda de todos os trabalhos que me têm sido propostos. Quero expressar a minha profunda gratidão por me ter dado a oportunidade de realizar estes trabalhos consigo, sendo ser uma honra ter a sua orientação no meu doutoramento. Seu apoio e orientação têm sido inestimáveis. Obrigada pela sua amizade e partilha de conhecimentos. A sua dedicação a esta causa e aos doentes é verdadeiramente avassaladora. Obrigada por ter cruzado no meu caminho. Tem sido um privilégio trabalhar sob sua supervisão nos últimos 8 anos. Seu apoio e compreensão me motivou a concluir este projecto e sou muito grata pela sua prática e *feedback* honesto. O Professor Doutor Mamede de Carvalho tem sido um excelente ouvinte e forneceu incentivo, mas também a essencial revisão crítica ao longo deste projecto.

Agradeço também a minha Co-Orientadora e amiga, Professora Doutora Filomena Carvalho. Sem a sua grande ajuda, apoio contante e confiança no meu trabalho, não seria possível que eu chegasse ao fim deste meu percurso académico. Obrigada por tudo, e que venham muito anos de amizade pessoal e partilha de projectos de investigação.

Ao Professor Nuno Santos, quero agradecer a sua grande disponibilidade e gentileza em aceitar que uma parte do meu trabalho fosse realizada na sua

Unidade. É de facto um privilégio poder trabalhar com o seu grupo. Obrigada pelo apoio e confiança.

Gostaria de agradecer aos membros do meu Comité de Tese, Professora Doutora Júlia Costa, Professor Doutor Gabriel Miltenberger-Miltenyi e Professora Doutora Vera Geraldès, que acompanharam a evolução do meu trabalho, dando-me alguns conselhos importantes, nas valiosas discussões havidas.

Ao Professor Fausto Pinto e toda a Direcção da FMUL, agradeço o inestimável apoio, nomeadamente a bolsa para pagamento das propinas do Doutoramento (sem a qual o Doutoramento não teria sido possível), e a possibilidade para representar a nossa Faculdade quer em Portugal, quer no Estrangeiro, para apresentação de resultados em Congressos. Obrigada!

O meu obrigada para a Dra. Isabel Aguiar, sempre disponível para ajudar.

Agradeço à minha querida amiga Teresa Freitas, pessoa incrível e maravilhosa, sempre pronta a ajudar e apoiar-me, espero que esta amizade seja para sempre, porque amizades verdadeiras e genuínas no local de trabalho são raras.

A ti, Marta, obrigada pelo teu suporte, a tua ajuda e incentivo foram muito importantes nesta fase da minha vida. É um prazer trabalhar com pessoas assim.

Obrigada Mariana, por tudo o que tu és, uma pessoa fantástica, com um coração enorme, espero que consigamos continuar esses nossos trabalhos de investigação, e que termines o curso de Medicina e o teu Doutoramento com a excelência a que estou habituada a ver em ti.

À Catarina Lopes, agradeço todo o apoio que me deste nestes últimos anos, sempre disponível. Obrigada pelo teu excelente profissionalismo e todo o trabalho do AFM, zeta e do fibrinogénio γ' . A tua capacidade de trabalho e dedicação faz de ti uma excelente profissional, é um prazer trabalhar contigo. Obrigada por tudo.

Obrigada João Morgadinho pelo teu apoio e excelente empenho e dedicação no trabalho da creatinina, a tua ajuda foi fundamental para que este se realizasse. Agradeço toda a partilha da literatura científica.

Agradeço, ao Vasco a inestimável ajuda na estatística, e com constante simpatia e grande vontade de ajuda.

Na Fisiologia, encontrei uma família fantástica de pessoas boas e com muita sabedoria e gosto pelo saber, e sobretudo a vontade e gosto pelo ensino.

Agradeço a Professora Doutora Isabel Rocha sempre disponível e quem sempre me transmitiu o gosto pela ciência, com uma palavra de encorajamento.

À minha querida amiga Vera, amiga do meu coração, sempre disponível, tens um coração enorme e uma disponibilidade para ajudar. Tens sempre uma palavra amiga e agradeço por estares sempre disponível. Agradeço a tua presença em todos os momentos.

A todos os colegas que partilharam o meu dia-dia comigo e que sempre me apoiaram no meu trabalho e me incentivaram neste percurso. Agradecimento especial ao Dr. Nataniel Rosa e Engenheiro Cristiano Tavares pela vossa amizade e companheirismo ao longo destes anos. Agradecimento profundo à Helena Maria, à D.Anabela, à D. Helena, ao Pedro Pina e à D. Fátima Francisco, especialmente a esta última, que me tem ajudado imenso no laboratório, sempre muito disponível. Agradeço a simpatia da colega Raquel, partilhamos momentos de boa disposição. Obrigada, Cristina Varandas, sempre pronta a ajudar e com grande simpatia.

O meu obrigada, do fundo do meu coração à minha querida amiga Maria do Amparo Barros, o meu apoio incondicional, és e serás das melhores pessoas que conheço, uma amiga de verdade, uma pessoa que tem os sentimentos mais puros para com o outro. Estás para sempre no meu coração, não tenho palavras que possam descrever a minha amizade e gratidão.

As minhas “meninas” Ângela e Liana, as minhas doces meninas, obrigada por toda a vossa ajuda, obrigada por todos os bons momentos e partilha de sorrisos, e encorajamento. Vocês são únicas e muito especiais.

Sofia Amador. Obrigada por todo o apoio, ao enviar artigos científicos recentes.

Obrigada Sónia, pela tua força e ânimo constantes, agradeço a tua amizade e simpatia.

À minha mãe, nem tenho palavras para descrever o quanto te amo, tenho um orgulho enorme no ser humano que tu és, e tudo aquilo o que me ensinaste. Amo-te para sempre.

Obrigada Susana Martins por todos estes anos de amizade e todas as nossas conversas que tivemos, e as vezes que “gargalhamos” juntas, obrigada por estares sempre presente na minha vida.

Sílvia, agradeço a tua amizade de quase 30 anos, por todos os momentos bem passados e divertidos que passei contigo.

Obrigada Carla Lopes por fazeres parte da minha vida, e da minha família de afectos.

Agradeço à Ana Vilas Boas e Rita Vilas Boas, pela vossa presença na minha vida, obrigada pela vossa amizade, dedicação e cuidado.

Obrigada, queridas Carlota Santiago e Sofia Mello, pela vossa amizade e energia. Contagiam o mundo e os lugares onde passam. Um bem-haja, por estarem sempre perto de mim, e por humanizarem a Medicina.

Aos meus queridos primos, que vos adoro, que tem estado sempre do meu lado, obrigada Teresa, Nene, Zé e Nuno. Tenho um enorme orgulho em vocês.

Aos meus queridos irmãos e sobrinhos, obrigada por tudo, estarão sempre no meu coração.

As minhas manas emprestadas, obrigada Inês, Leonor e Guiga, por todos estes anos de amizade e dedicação, estarão sempre no meu coração.

Ao André, agradeço tudo o que fizeste por mim e todo o apoio que me deste ao longo da minha vida. A tua amizade será eterna.

Ao Rui, obrigada por todos os momentos em que estiveste sempre ao meu lado, pela tua amizade, amor e compreensão e todo o suporte que me tens dado.

E finalmente, mas ainda mais importante, as minhas meninas, Rita e Marta, os amores da minha vida, os meus tesouros. Agradeço, todos os dias por estarem na minha vida, vocês são o maior projecto de uma vida. Obrigada pelos sorrisos, pelas brincadeiras e por tornarem a minha vida mais colorida, e que me fazem todos os dias, sentir a mãe mais amada do mundo.

Importa referir que os trabalhos inseridos nesta tese foram maioritariamente financiados pelos projectos ONWebDUALS (JPND-PS/0001/2013), projecto Europeu coordenado pelo Professor Doutor Mamede de Carvalho, e pelo projecto da Fundação para a Ciência e Tecnologia PTDC/BBB-BMD/6307/2014 (coordenado pela Professora Doutora Filomena Carvalho).

Os trabalhos apresentados nesta tese foram realizados principalmente no Instituto de Medicina Molecular-João Lobo Antunes (unidades Mcarvalho e Nuno Santos), e nos Institutos de Fisiologia e de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. O candidato pertence ao programa de doutoramento do Centro Académico de Medicina de Lisboa. O projecto também foi realizado em colaboração com o Centro Hospitalar Universitário Lisboa-Norte e o Instituto Português do Sangue e Transplantação.

Além disso, agradeço, também, a várias Empresas e organizações pelas bolsas e prémios oferecidos, que me permitiram participar em várias reuniões Nacionais e Internacionais. Devo referir: Novartis, Boehringer Ingelheim, 8º Congresso de Pneumologia do Centro, e o XXII Congresso de Pneumologia do Norte.

LISTA DE ABREVIATURAS

Os acrónimos usados são descritos na primeira utilização e sempre que parecesse necessário melhorar a clareza. Acrónimos comuns, científicos ou não (como "Reino Unido") não são expandidos. Os resíduos de aminoácidos são geralmente indicados usando o código de uma letra.

Os acrónimos, na sua maioria, foram utilizados na língua inglesa para uma maior facilidade de leitura, uma vez que são os acrónimos mais utilizados na linguagem científica.

1H-MRS | Espectroscopia de ressonância magnética de prótons

24-HC | *24S-hydroxycholesterol*

4HNE | 4-hidroxinonenal

8-iso-PGF2 α | F2-isoprostano

8OH2'dG | 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

Ácido 3 β ,7 α -diHCA | 3 β ,7 α -Dihydroxycholest-5-en-26-oic

Ácido 3 β ,7 α - Δ 5-BA | 3 β ,7 α -Dihydroxychol-5-en-24-oic

Ácido 7 α H,3O- Δ 4-BA | 7 α -Hydroxy-3-oxocholest-4-en-26-oic

AD | Autossómico dominante

AD | Doença de *Alzheimer*

AFM | Microscopia de força atómica (do inglês "*Atomic Force Microscopy*")

ALS-FRS | Escala funcional da Esclerose Lateral Amiotrófica

ALS-FRS-R | Escala funcional da Esclerose Lateral Amiotrófica revista

ALS-PDC | Complexo ELA-Parkinson-demência

ALS-*TES* | Modelo de pele de engenharia de tecidos na ELA (inglês "*ALS tissue-engineered skin model*")

AMPA | Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico

ANG | Angiogenina (do inglês "*Angiogenin*")

ANXA11 | *Annexin A11*

apoB | Apolipoproteína B

AR | Autossómico recessivo

ASOs | Oligonucleótidos *antisense* (do inglês " *Antisense oligonucleotides*")

ATP | Adenosina Trifosfato

ATXN2 | *Ataxina 2* (do inglês " *Ataxin 2*")

BDNF | Factor Neurotrófico Derivado do Cérebro

bFGF | *Basic fibroblast growth factor*

BMAA | Aminoácido neurotóxico não-proteico β-N-metilamino-L-alanina (do inglês " *β-methylamino-L-alanine*")

C21orf2 | *Cilia and flagellaassociated protein 410*

C3b-α chain | Cadeia α) do componente C3b do complemento

C5a | Fragmento proteico libertado da clivagem do componente C5 do complemento

C5b-9 | Terminal Complemento Complexo C5b-9

C9FTD/ELA | Termo colectivo utilizado para as doenças associadas a **C9orf72** | *Chromosome 9 open reading frame 72*

Ca²⁺ | Ião cálcio

CaCl₂ | Cloreto de Cálcio

CC-16 | *Club Cell secretoty protein*, células de clara, CC-10, CCSP ou Uteroglobina

CCNF | *Ciclina F* ((do inglês " *Cyclin F*")

CD | Controlos doentes

Células Treg | Células T reguladoras

CHCHD10 | *Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10*

CHI3L1, YKL-40 | Proteína 1 semelhante à quitinase-3

CHI3L2, YKL-39 | Proteína 1 semelhante à quitinase- 2

CHIT1 | Quitotriosidase-1

CHMP2B | Gene que codifica a proteína 2B modificadora da cromatina (do inglês " *Charged Multivesicular body protein 2B*")

Ck | Creatina quinase

CNTF | Factor neurotrófico ciliar

Cr | Creatinina

CS | Controlos saudáveis

CV | Capacidade Vital

DCTN1 | Dinactina 1 (do inglês " *Dynactin subunit 1*")

DN | *de novo*

DNA | Ácido desoxirribonucleico

DNM | Doença do Neurónio Motor

DP| Desvio padrão

DPOC| Doença pulmonar obstrutiva crónica

DPRs| Dipeptide repeat proteins

E| Módulo de *Young* (do inglês " *Young modulus*")

EAAT2| Proteína transportadora do aminoácido excitatório 2

EGF| Factor de crescimento epidérmico

EI| Índice de alongamento

ELA| Esclerose Lateral Amiotrófica

ELISA| Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês " *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*")

ELP3| Proteína 3 complexa do codificador de alongamento (do inglês " *Elongator complex protein 3*")

EM| Esclerose Múltipla

EMA| Agência Europeia do Medicamento

EMF| Campos electromagnéticos

EMG| Electromiografia

EPHA4| *Receptor tyrosine kinase, erythropoietin-producing hepatocellular A4*

ER| Retículo endoplasmático

ERBB4| *Receptor protein kinase erb4*

EWSR1| *Ewing sarcoma breakpoint region 1*

FALS| Forma familiar de ELA

FDA| *Food and Drug Administration*

FGF| Factor de crescimento de fibroblastos

Fibrinogénio (γ)| Fibrinogénio gama'

FIG4| *Phosphoinositide 5-phosphatase*

FoxP3| *Forkhead box protein P3 (protein involved in immune system responses)*

FR|Factor de Risco

FTD| Demência fronto-temporal

FUS| Proteína de ligação ao RNA- proteína *fundida* em *sarcoma* (do inglês" *Fused in sarcoma*"ou **FUS-TLS** -*Fused in sarcoma/translocated in liposarcoma*).

FVC|Capacidade Vital Forçada

G4C2 ou GGGGCC| Repetição de hexanucleótidos GGGGCC na região do primeiro intrão, ou promotor do gene *C9orf72*

G-CSF | Factor estimulante de colónias de granulócitos

GLE1 | *Nucleoporin GLE1*

Glu-Gal Hyl | Glicosilgalactosil hidroxilisina

GM-CSF ou GM-LCR | Factor estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos

GRIA4 | Receptor de glutamato 4

GSH | Glutatião reduzido

GSSG | Glutatião oxidado

GWAS | Estudos de associação genómica generalizada (do inglês "*genome-wide association studies*")

HDL-C | Lipoproteína de alta densidade

HNRNPA1 | *Heterogeneous nuclear ribonuclear protein A1*

HNRNPA2B1 | *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1*

IFN | Interferão

IHC | Imuno-histoquímica

IL | Interleucina

IMC | Índice Massa Corporal

IR | Insuficiência Respiratória

K⁺ | Ião Potássio

KH₂PO₄ | *Fosfato monopotássico*

KIF5A | *Kinesin family member 5A*

LCR | Líquido Cefalorraquidiano

LDL-C | Lipoproteína de baixa densidade

LMN | Segundo Neurónio

LoF | Loss of Function

M | Molar

MATR3 | *Matrin 3*

MCP-1 | Proteína quimioatraente de monócitos-1

MEP | Pressão expiratória máxima

MGLURs | Receptores Metabotrópicos

MIP | Proteína inflamatória de macrófagos

MIP | Pressão inspiratória máxima

miRNAs | MicroRNAs

MLG | Massa livre de gordura

mM | Milimolar

MMT | Teste muscular manual

MND| Doença Neurónio Motor (do inglês “*motor neuron disease*”)
MRC| *Medical Research Council* (escala de força muscular modificada de MRC)
MRC| Escala de avaliação da Força Muscular da Medical Research Council
mSOD1| SOD1 mutante
Na⁺| Ião Sódio
NA| Não aplicável
Na₂HPO₄| *Fosfato* dissódico
NaCl| Cloreto de sódio
NC | Sem alteração observada
NEK1| *NIMA Related Kinase 1*
NFH| Neurofilamentos de Cadeias Pesadas Fosforiladas
NF-kB| Factor nuclear kappa B
NFL| Neurofilamentos de Cadeia Leve
NIV| Ventilação não invasiva
NK |Células exterminadoras naturais células *NK* (do inglês “*Natural Killer Cell*”)
NMDA| Receptores N-Metil-D-Aspartato
NR| Não reportado
NRF-2| Factor nuclear eritroide 2 relacionado com factor 2
O₂| Oxigénio
OPTN| Optineurina (do inglês “*Optineurin*”)
OXR1| Gene de resistência à oxidação 1 (do inglês” *Oxidation Resistance 1*”)
P₅₀| Valor da pressão parcial de O₂ para a qual a hemoglobina está saturada a 50%
p75^{ECD}| Receptor de neurotrofina p75
PaCO₂| Pressão parcial de dióxido de carbono
PaO₂| Pressão parcial de oxigénio
PBP| Paralisia bulbar progressiva
PCF| Pressões máximas e pico de fluxo de tosse
PCR| Proteína C Reactiva
PD| Doença de *Parkinson*
PET| Tomografia por Emissão de Positrões
PFN1| *Profilina 1*
Phren| Respostas motoras diafragmáticas por estimulação do nervo frénico

PhrenAmpI| Amplitude pico-a-pico das respostas motoras diafragmáticas por estimulação do nervo frénico

PLS| Esclerose Lateral Primária

PMA| Atrofia Muscular Progressiva

pN| *Piconewton*

PRO-ACT | “the Pooled Resource Open-Access ALS Clinical Trials database”

PtcCO2| Capnometria transcutânea

PTPIP51| Proteína tirosina fosfatase 51

REM| Movimento rápido dos olhos (inglês “*Rapid Eye Movement*”)

RIA| Rádio-imunoensaio

RNA| Ácido ribonucleico

RNA_m| RNA mensageiro

RNS| Espécies reactivas de nitrogénio

ROS| Espécies reactivas de oxigénio

SALS| Forma esporádica de ELA

SA-PE| Conjugado repórter estreptavidina-ficoeritrina

SD| Desvio padrão

SETX| *Senataxin*

SIGMAR1| *Sigma Receptor 1* (do inglês “*Sigma non-opioid intracellular receptor 1*”)

SNA| Sistema nervoso autónomo

SNC| Sistema nervoso central

SNIP| Pressão durante uma inspiração nasal forçada

SNP| Sistema nervoso periférico

SNPS| Sistema nervoso parassimpático

SNS| Sistema nervoso simpático

SOD1| Enzima Cobre-Zinco superóxido dismutase-1

SOPs| Procedimentos Operacionais Padronizados (do inglês “*Standard Operational Procedure*”)

SPG11| *Spatacsin*

SQSTM1; **p62**| *Sequestosoma 1*; *p62*

SVC| Capacidade vital lenta (inglês “*Slow Vital Capacity*”)

T *Treg* | Células T regulatórias

TAF15| *TATA-Box Binding Protein Associated Factor 15*

TARDBP| Gene que codifica a proteína TDP-43 (do inglês "*43Transactive Response DNA/ RNA-binding protein*")

TBK1 (NAK ou T2K)| *Tank-binding kinase 1*

TDP-43| Proteína TAR de ligação DNA 43kDa

TGF-β1| Factor de crescimento transformante- β1 (*transforming growth factor beta*)

TIA1| *T-cell intracellular antigen 1*

TLDc| Domínio C terminal das proteínas OXR1

TLR2| *Toll-like receptor 2*

TLR4| *Toll-like receptor 4*

TNF-α| Factor de Necrose Tumoral Alfa

TQNE| Avaliação quantitativa da força muscular de *Tufts*

TUBA4A| *Tubulin alpha 4a*

Tw Pdi| Pressão transdiafragmática de contração

UBQLN-2| Ubiquilina-2 (do inglês "*Ubiquilin 2*")

UMN| Primeiro Neurónio

UPR| Resposta a proteínas mal enoveladas (do inglês "*Unfolded Protein Response*")

VAPB| Proteína membrana associada a vesículas (do inglês "*vesicle Associated-associated protein B*")

VC| Capacidade Vital

VCP| Valosina (do inglês "*Valosin-containing protein*")

VEGF| Factor de crescimento endotelial vascular

Vs| *Versus*

VVM| Ventilação Voluntária Máxima

WES| Estudos de *Sequenciamento total do exoma* (do inglês "*Whole-exome sequencing*")

WFN | Federação Mundial de Neurologia (do inglês "*World Federation of Neurology*")

XL|Ligado ao X

RESUMO

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa de progressão rápida e fatal, caracterizada pela rápida destruição dos neurónios motores localizados no córtex motor, tronco cerebral e na medula espinhal, associada a um processo neuro-inflamatório cujo papel etiopatogénico não está bem esclarecido. Clinicamente, observa-se uma grave diminuição da força muscular, envolvendo os membros superiores e inferiores, os músculos da deglutição e da fala, e os músculos respiratórios. A insuficiência respiratória é a principal causa de morte, que ocorre, em geral, 3-5 anos após o aparecimento dos primeiros sintomas. A maioria dos casos de ELA, 90-95%, são de etiologia desconhecida (ELA esporádica). Nos restantes 5-10% dos casos há outros membros afectados na família (ELA familiar).

O único fármaco aprovado na Europa, Riluzol, apenas confere um modesto aumento na sobrevida destes pacientes. Actualmente, nenhum tratamento de relevante eficácia está disponível, apesar dos persistentes esforços para encontrar novos medicamentos, resultando em centenas de ensaios clínicos muito dispendiosos. Tal deve-se, sobretudo, ao facto dos mecanismos envolvidos na origem da ELA serem complexos, multifactoriais e não conhecidos. O diagnóstico da doença demora cerca de 9-12 meses, fundamentalmente devido à ausência biomarcadores moleculares de diagnóstico.

Sendo um determinante crítico do prognóstico, a função respiratória deve ser monitorizada no curso da progressão da doença. Tal processo ocorre pela avaliação clínica e execução de provas da função respiratória, eventualmente complementada com métodos de imagem ou neurofisiológicos. Não tem havido um marcador molecular que seja relevante para o diagnóstico precoce ou no prognóstico da insuficiência respiratória. Tal pode ter implicações na implementação de medidas adequadas de reabilitação respiratória, tal como o suporte ventilatório.

Nesta tese, pretendeu-se identificar novos biomarcadores relacionados com a insuficiência respiratória na ELA. Como objectivo secundário explorou-se a

associação entre a função respiratória e as propriedades eritrocitárias, de forma a melhor compreender a hipóxia tecidual.

De modo a identificar um biomarcador molecular de disfunção respiratória na ELA, estudaram-se a proteína *Club cell secretory protein* (CC-16), a interleucina-6 (IL-6), e a creatinina (Cr). Adicionalmente, analisou-se o papel do fibrinogénio γ' na ELA como marcador da disfunção respiratória e da inflamação na ELA.

Relativamente às propriedades eritrocitárias efectuou-se a caracterização biofísica, hemorreológica e morfológica destas células.

Foram incluídos doentes com ELA regularmente seguidos na consulta dedicada a esta doença na Unidade de Neuromuscular do CHULN-H Santa Maria, respeitando os critérios de diagnóstico para esta doença e excluindo doentes com outras patologias médicas. Os valores obtidos foram comparados com os obtidos numa população de controlo com similar idade e distribuição por género. Os doentes tiveram seguimento regular na consulta, com avaliação clínica (escala funcional ALSFRS-R), provas de função respiratória (espirometria, pressões máximas, SNIP, estudo neurofisiológico do nervo frénico) e registo dos eventos, como a data da introdução da ventilação não-invasiva, a morte ou a traqueostomia.

Foram aplicadas diversas técnicas laboratoriais, em particular ELISA (CC-16), tecnologia Multiplex (IL-6), microscopia de força atómica (AFM), medidas do potencial Zeta e técnicas hemorreológicas, para além de outras técnicas e metodologias utilizadas de rotina no nosso centro.

Os resultados mostraram que na população de doentes os valores de CC-16 estavam significativamente mais elevados, sem correlação com a idade, forma de apresentação ou duração da doença, ALSFRS-R, FVC (*Forced vital capacity*) ou com a amplitude da resposta do nervo frénico. No entanto os doentes com níveis mais elevados de CC-16 apresentavam um risco acrescido da necessidade de ventilação não-invasiva nos seis meses seguintes, e tendiam para uma maior mortalidade nos 30 meses seguintes.

Níveis aumentados de IL-6 foram observados doentes com ELA, quando comparados com o grupo controlo. Nestes, os valores tinham correlação positiva com a idade. Na população de doentes, foi encontrada uma correlação negativa independente da idade entre os níveis de IL-6 e os valores da amplitude da resposta do nervo frénico.

Embora a creatinina seja um factor preditivo da perda funcional e da sobrevida, na ELA, na nossa amostra não foi possível confirmar ser este marcador preditor da função respiratória (FVC) ou do seu declínio.

Da avaliação da quantificação plasmática do fibrinogénio γ' observaram-se valores mais elevados nos pacientes de ELA quando comparados com o grupo controlo, níveis mais elevados foram associados a maior sobrevida.

Os eritrócitos de doentes ELA, estavam morfológicamente alterados quando comparados com os eritrócitos do grupo controlo, tendo uma membrana menos rugosa, menor área, menor volume, menor diâmetro, mas sendo mais alongados. Os eritrócitos dos pacientes de ELA tendem a perder a concavidade. Adicionalmente, por quantificação do potencial Zeta, observou-se que a carga superficial da membrana eritrocitária é mais negativa, quando comparada com os controlos. Estudos de espectroscopia de força por AFM para analisar as propriedades elásticas dos eritrócitos revelaram que os eritrócitos dos pacientes de ELA são mais deformáveis, menos rígidos e têm maior profundidade de penetração que os eritrócitos dos indivíduos controlo.

Em suma, os resultados revelam um aumento da resposta inflamatória pulmonar relacionada com a disfunção respiratória. As alterações nas propriedades hemorreológicas e morfológicas dos eritrócitos poderão promover interações entre moléculas inflamatórias e o eritrócito, eritrócito-fibrinogénio e/ou eritrócito-eritrócito, promovendo um factor de risco adicional para eventos tromboembólicos venosos e de hipoxia tecidual, associados à progressão da doença. Em resumo, os nossos resultados permitiram:

- 1- Identificar potenciais novos marcadores moleculares de disfunção respiratória na ELA, com valor preditivo no diagnóstico e prognóstico, bem como potencial utilização em futuros ensaios clínicos;
- 2- Identificar alterações na elasticidade e rigidez dos eritrócitos dos pacientes de ELA bem como alterações morfológicas no eritrócito e hemorreológicas, nos pacientes com ELA.

Os resultados da tese devem incentivar estudos futuros. O papel das alterações da membrana eritrocitária na hipoxia tecidual é uma questão inovadora relevante que merece uma investigação mais profunda.

Palavras-chave

Esclerose lateral amiotrófica (ELA)

Biomarcadores

Insuficiência respiratória (IR)

Hipóxia

Eritrócitos

ABSTRACT

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a rapidly progressive and fatal neurodegenerative disease characterized by the rapid destruction of motor neurons in the motor cortex, brain stem and spinal cord, associated with a neuroinflammatory process whose etiopathogenic role is not yet well understood. Clinically, there is a severe weakness involving the upper and lower limbs, swallowing and speech muscles, and the respiratory muscles. Respiratory failure is the leading cause of death, which usually occurs 3-5 years after the onset of the first symptoms. Most cases of ALS are sporadic, meaning no family history (90-95%), in the remaining 5-10% of cases there are other affected family members (familial ALS).

Riluzole is the only drug approved in Europe, but confers a modest improvement in the survival of these patients. Currently, no effective treatment is available despite a huge international effort in hundreds of very expensive clinical trials to find a new drugs. This insucess history derives from the ignorance of the mechanisms involved in the origin of ALS, which are complex and multifactorial. The diagnostic delay is typically 9-12 months, mainly due to the absence of diagnostic molecular biomarkers.

Being a critical predictor of prognosis, respiratory function should be monitored in the course of the disease progression. This includes clinical evaluation and a number of respiratory function tests, possibly complemented with imaging and neurophysiological methods. There has been no respiratory molecular biomarker relevant for early diagnosis or prognosis. This might have implications for the implementation of appropriate respiratory rehabilitation measures, such as ventilatory support.

In this thesis, we aimed to identify new biomarkers related to respiratory failure in ALS. As a secondary objective, the association between respiratory function and erythrocyte properties was explored to better understand tissue hypoxia.

In order to identify a molecular biomarker of respiratory dysfunction in ALS, Club cell secretory protein (CC-16), interleukin-6 (IL-6), and creatinine (Cr) were studied. Additionally, the role of the γ ' fibrinogen in ALS as a marker of respiratory dysfunction

and inflammation in ALS was analyzed, to study the relation between plasma levels of this protein and disease progression.

Regarding the erythrocyte properties, the biophysical, hemoreological and morphological characterization of these cells was performed.

In this project, we included ALS patients regularly followed at the out-patient clinic dedicated to this disease, in the Neuromuscular Unit of Santa Maria's Hospital ("Unidade de Neuromuscular do CHULN-H Santa Maria"), respecting the diagnostic criteria for this disease. Patients with other medical conditions were excluded. The values obtained were compared with those obtained in a control population, matched for age and gender. Patients were assessed by clinical evaluation (ALSFERS-R functional scale), respiratory function tests (spirometry, maximal pressures, SNIP, phrenic nerve study) and by critical events, such as the date non-invasive ventilation initiation, and tracheostomy or death.

Several laboratory techniques have been applied, in particular ELISA (CC-16), Multiplex technology (IL-6), atomic force microscopy (AFM), Zeta potential measurements and hemorheological techniques, in addition to other routinely used techniques and methodologies.

The results have shown that in the patient population, CC-16 values were significantly higher, with no correlation to age, phenotype, disease duration, ALSFRS-R, forced vital capacity (FVC) or with the amplitude of the phrenic nerve response. However, patients with higher levels of CC-16 were at increased risk of the need for noninvasive ventilation (NIV) over the following six months, and tended to have higher mortality over the subsequent 30 months.

Increased levels of IL-6 were observed in ALS patients when compared to the control group. In this control group, IL-6 values had a positive correlation with age. In the patient population, a negative age-independent correlation was found between IL-6 levels and phrenic nerve response amplitude. Although creatinine is a predictor of functional loss and mortality in ALS, it was not possible to confirm in our sample that creatinine was a predictor of respiratory function (FVC) or its decline rate.

From the quantification of plasma γ' fibrinogen, we observed higher values in ALS patients when compared to the control group. Higher levels are associated with longer survival in ALS.

Erythrocytes in ALS patients were morphologically modified as compared to the control group, having a decreased rough membrane, smaller area, smaller volume, smaller diameter, but being more elongated. Erythrocytes of ALS patients tend to lose their concavity. Moreover, by measuring the Zeta potential, it was observed that the erythrocyte membrane surface charge was more negative in ALS when compared to controls. The AFM force spectroscopy studies performed in order to analyze erythrocyte elastic properties have shown that in ALS patients they were more deformable, less rigid, and with greater penetration depth than erythrocytes from control subjects.

Our results support an increased inflammatory response related to pulmonary dysfunction. Changes in hemorheological and morphological properties of erythrocytes may promote interaction between inflammatory molecules and erythrocyte, erythrocyte-fibrinogen and/or erythrocyte-erythrocyte, causing an increased risk of venous thromboembolic events and tissue hypoxia, associated with disease progression. In summary, our results allowed to:

- 1- Identify potential new molecular markers of respiratory dysfunction in ALS, with predictive value in diagnosis and prognosis, as well as suggesting its potential use in future clinical trials;
- 2- Identify alterations in erythrocyte elasticity and stiffness, as well as hemorheological morphological changes, in ALS patients.

The results of the thesis should encourage future studies. The role of erythrocyte membrane alterations in tissue hypoxia is a relevant innovative issue that deserves further investigation.

Keywords|

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)

Biomarkers

Respiratory insufficiency (RI)

Hypoxia

Erythrocyte



INTRODUÇÃO

“Let us keep looking, in spite of everything. Let us keep searching. It is indeed the best method of finding, and perhaps thanks to our efforts, the verdict we will give to such a patient tomorrow will not be the same we must give this man today.”

Jean-Martin Charcot (1889)

1.1.INTRODUÇÃO

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa devastadora e fatal, caracterizada pela rápida progressão da degeneração dos neurónios motores na medula espinhal, tronco cerebral e córtex motor, conduzindo à severa fraqueza e atrofia dos músculos voluntários, paralisia e morte, a qual, em geral, sucede de 3 a 5 anos após o início da doença. As principais causas de morte dos doentes com ELA derivam da fraqueza dos músculos respiratórios, condicionando a insuficiência respiratória (IR).¹⁻⁴

Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na degeneração selectiva dos neurónios motores na ELA são complexos, multifactoriais e ainda não completamente esclarecidos. A maioria dos casos de ELA são esporádicos, contudo cerca de 5-10% dos pacientes têm uma história familiar positiva.^{2,4,5}

O padrão típico na ELA familiar consiste na hereditariedade autossómica dominante, no entanto a penetrância é bastante variável. As duas mutações mais relevantes envolvem o gene que codifica a enzima Cu/Zn superóxido dismutase (SOD1)^{2,4,6} e a expansão intrónica *C9orf72*^{7,8} representando esta, cerca de 10% dos doentes em Portugal.⁹ No entanto, mais de 30 outros genes disfuncionais^{2,4,5} foram descritos na ELA familiar, como os genes da alsina, senataxina, vesícula associada à proteína B de membrana VAPB (*vesicle associated-associated protein B -VAPB*), angiogenina, Proteína TAR de ligação ao DNA de 43 kDA (*TAR DNA-binding protein 43-TARDP*), proteína de ligação ao RNA- proteína fundida em sarcoma (*FUS*), optineurina (*OPTN*), Ubiquilina-2 (*UBLN-2*) e, recentemente, TBK-1^{10,11} e MATR 3.⁶ A ELA tem uma forte associação com a demência fronto-temporal (FTD).¹² Aproximadamente 10% dos pacientes com ELA têm demência fronto-temporal associada, sendo que algumas mutações, em particular *C9orf72*, podem causar ELA, FTD ou ambas as situações no mesmo paciente.¹¹

A presença de agregados insolúveis de proteínas intracelulares nos neurónios motores, de astrócitos reactivos e a acumulação de neurofilamentos são consideradas como os principais marcadores celulares na ELA.^{11,13,14} Aqueles agregados podem lesar as mitocôndrias¹⁵ e o sistema proteossómico. A libertação de citocromo C pelas mitocôndrias danificadas causa activação da caspase (caspase-9), originando a apoptose.^{14,15} Uma vez que o curso clínico é altamente variável, é possível que vários factores contribuam para o processo da doença.^{3,11,13}

A acumulação de neurofilamentos perturba o fluxo axoplásmico condicionando disfunção metabólica do neurónio motor.^{16,17} Por outro lado, existe larga evidência molecular e neurofisiológica que suporta a excitotoxicidade mediada por glutamato na etiopatogénese da doença. Na ELA, verifica-se um defeito no transporte de glutamato para o interior dos astrócitos devido à disfunção do receptor EAAT-2.^{3,11,18} Esta sobre-excitação dos receptores de glutamato induz aumento do cálcio intracelular com activação de enzimas intracelulares lesivos da célula.^{3,11,18} Por outro lado, a activação primária ou secundária da microglia causa a libertação de mediadores pró-inflamatórios, originando uma cascata tóxica de eventos que resultam na morte neuronal.¹⁹ Um mecanismo adicional que tem sido apontado consiste na diminuição de factores neurotróficos relacionados com astrócitos lesados.¹⁹ Uma vez que a etiologia da ELA não é totalmente compreendida, nenhum tratamento foi ainda encontrado capaz de travar a progressão da doença, embora o Riluzol prescrito aos doentes nos últimos 20 anos condicione um modesto aumento da sobrevida.^{2-4,11}

Ao longo dos últimos anos, um vasto número de biomarcadores respiratórios têm sido descritos e utilizados para monitorizar a actividade das doenças pulmonares. No entanto, os mesmos não têm sido explorados na ELA.²⁰⁻²³

Alguns testes respiratórios convencionais são sensíveis na detecção da disfunção ventilatória na ELA, no entanto o seu valor preditivo para a sobrevida ou para o declínio funcional é questionado nos doentes com manifestação bulbar.²⁴ Interessantemente, nenhum biomarcador molecular de IR foi identificado até ao momento na ELA. Tal biomarcador seria particularmente útil uma vez que os testes respiratórios convencionais têm limitações relevantes, quer pela fraqueza oro-facial nos doentes com manifestação bulbar (que impede uma adequada vedação boca-tubo durante a realização dos testes respiratórios), quer pela insuficiente cooperação dos pacientes, em particular naqueles com defeito cognitivo.²⁴

O nosso grupo tem investigado as respostas motoras por estimulação do nervo frénico,²⁵ assim como a utilização da ecografia para estimar a espessura do diafragma,²⁶ como possíveis ferramentas para a detecção precoce da IR na ELA, mas ambas as técnicas exigem grande experiência do operador.

Primeiramente, propusemo-nos investigar um conjunto de biomarcadores moleculares promissores, para avaliar a função respiratória, em particular quanto

ao prognóstico. Particularmente testamos a proteína CC-16, a IL-6 e a creatinina.²⁷⁻³⁰

A CC-16 e a IL-6 têm sido estudados na doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC). O nível plasmático de CC-16 (uma proteína predominantemente segregada pelas células de clara localizadas tanto no epitélio brônquico terminal como no epitélio bronquiolar respiratório), está associada ao declínio da função pulmonar nesta doença pulmonar. Os níveis de IL-6 (citocina envolvidas na inflamação sistémica e resposta imunológica) estão relacionados com a inflamação e mortalidade na doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC).^{29,31} A IL-6 pode promover alterações na coagulação e pode ter efeitos sobre os eritrócitos, devido ao facto de possuir um sítio de ligação universal em todas as células, incluindo os eritrócitos.³²

A creatinina é um forte indicador de massa muscular e foi descrita na ELA, como um factor prognóstico independente para o declínio funcional e morte.³³ No entanto o seu valor como marcador do envolvimento respiratório na ELA nunca foi antes investigado.

Têm sido descritas anormalidades nos eritrócitos na doença de Alzheimer (DA), com eventual repercussão na hipóxia tecidular do sistema nervoso central.³⁴ É bem conhecido que a hipóxia pode condicionar inflamação crónica.³⁴ Na doença de Alzheimer, os eritrócitos têm sido descritos como mais alongados e com outras alterações na arquitectura da membrana.³⁴ Eventuais alterações nestas células nunca foram descritas na ELA. Os eritrócitos, sendo os sacos de heme-ferro que permite o transporte de oxigénio para todos os tecidos via hemoglobina,³⁴ poderiam ter um papel importante na hipóxia tecidular na ELA.

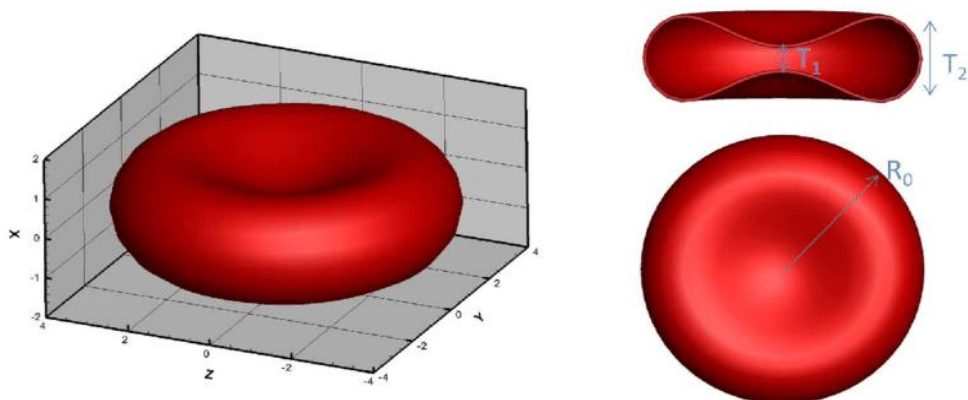


Figura 1 | Geometria dos eritrócitos.

Adaptado de Cetin 2018.³⁵

O fibrinogénio é a terceira proteína plasmática mais abundante e desempenha um papel proeminente no processo inflamatório.³⁶ As concentrações elevadas têm sido associadas a um maior risco cardiovascular e maior risco de tromboembolismo venoso. O fibrinogénio gama' (γ') é uma variante da cadeia gama presente como um heterodímero (<15%) ou como um homodímero (1% -3%) *in vivo*, como parte das formas de fibrinogénio circulante no plasma humano.^{37,38}

A trombose venosa profunda é uma complicação comum na ELA.^{39,40} Quando os coágulos de fibrina são formados na presença do fibrinogénio γ' , eles são mais resistentes à fibrinólise, porque a cadeia γ' contém um local de ligação para a trombina.⁴¹ Além disso, as propriedades dos glóbulos vermelhos, em particular a deformabilidade, têm sido associadas a um aumento do risco de trombose. O fibrinogénio tem sido utilizado como biomarcador de doença respiratória como DPOC, nomeadamente quanto à severidade da doença, progressão e mortalidade.

Desta forma, na última fase dos trabalhos desta tese, investigamos as características e propriedades biofísicas dos eritrócitos, assim como a expressão do fibrinogénio γ' na ELA. Na ELA, existe um risco aumentado de trombose venosa e lesão cerebrovascular,⁴² o que sugere disfunções ainda não dissecadas das propriedades hemodinâmicas. Tal pode resultar de anormalidades na membrana dos eritrócitos (por exemplo, na viscoelasticidade), que depende do seu conteúdo lipídico, como a fosfatidilcolina ou esfíngolípido,⁴³ entre outros factores. A principal função fisiológica dos eritrócitos está relacionada com a capacidade da membrana celular ligar e transportar oxigénio para todos tecidos através da hemoglobina.⁴⁴

Actualmente é possível medir a elasticidade celular em função do tempo e do estado fisiológico, bem como a capacidade de adesão celular.^{45,46} A técnica de espectroscopia de força atômica (AFM) permite a caracterização das propriedades micromecânicas em sistemas celulares, desta forma contribuindo na compreensão da função e das propriedades fisiológicas das células, incluindo a rigidez dos eritrócitos.⁴⁷⁻⁴⁹

Potencialmente a identificação de alterações nos eritrócitos poderá consistir numa nova via de abordagem terapêutica.

1.2. ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA)

1.2.1. Contextualização Histórica

A ELA foi descrita pela primeira vez pelo neurologista francês Jean-Martin Charcot em 1869, como uma entidade clínico-patológica, detalhada em trabalhos subsequentes.⁵⁰⁻⁵² No entanto, antes disso, Bell (1824), Aran (1850), Duchenne (1851) e Cruveilhaer (1853) fizeram importantes observações que contribuíram para a compreensão da síndrome clínica e patológica.^{53,54,55} A doença tornou-se conhecida nos Estados Unidos quando o jogador de beisebol Lou Gehrig foi diagnosticado com a doença, em 1939. Desde então, essa doença também é conhecida como “*doença de Lou Gehrig*”, nos Estados Unidos.^{56,57} Para além de ser conhecida como a doença de Charcot, a ELA também é denominada de doença do Neurónio Motor (MND- *motor neuron disease*), em particular no Reino Unido.



Figura 2| Jean-Martin Charcot.

Ilustre neurologista e o primeiro que descreveu a ELA numa publicação em Paris (1869).

O termo doença do neurónio motor enquanto conceito mais lato, foi inicialmente proposto por Lord Russel Brain, para incorporar várias outras doenças do neurónio motor, como paralisia bulbar progressiva (PBP), a atrofia muscular progressiva (PMA), a esclerose lateral primária (PLS), o síndrome de Vulpian-Bernhardt, a apresentação *flail leg* e a ELA com envolvimento multissistémico (por exemplo, ELA-demência).^{54,58,59}

1.2.2. Definição: O que é a Esclerose Lateral Amiotrófica?

O termo "*Lateral sclerosis*" refere-se à gliose, cicatrização e "endurecimento" dos tractos corticospinais anterior e lateral, à medida que a via piramidal degenera.

"*Amyotrophy*" refere-se à atrofia das fibras musculares, decorrente da perda de unidades motoras à medida que os neurónios motores medulares e do tronco cerebral degeneram, levando à fraqueza dos músculos afectados e às fasciculações.^{54,60}

O sistema motor é composto por neurónios motores corticais (1º neurónio motor-UMN) e por neurónios motores no tronco cerebral e na medula espinhal (2º neurónio motor-LMN), que inervam o músculo esquelético (Figura 3).

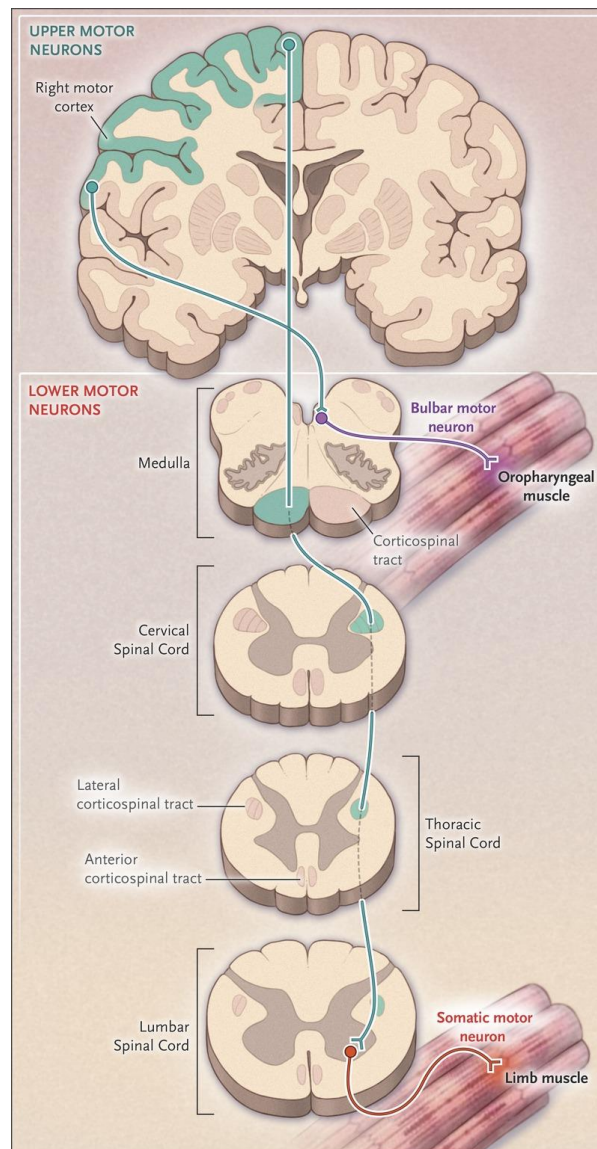


Figura 3| O Sistema Motor.

Neurónios motores selectivamente afectados na ELA. Adaptado de *Brown et al.* (2017).⁶¹

1.2.3. Diagnóstico/Critérios de Classificação

As manifestações clínicas, bem como a progressão dos sintomas da ELA, são heterogêneas. Variam de acordo com o predomínio de neurónio afectado, da localização topográfica, bem como com a idade, o genótipo e outros factores.^{11,54,61,62} A perda do UMN (córtex motor), resulta em espasticidade, hiperreflexia, clónus, sinais de Hoffman e Babinsky. Quando o LMN é predominantemente afectado (núcleos motores do tronco cerebral e corno anterior da medula espinhal), observamos fasciculações, perda de massa muscular (atrofia) e falta de força.⁶³

O fenótipo medular (parésia dominante dos membros superiores e/ou inferiores) é responsável por cerca de 70% dos casos de ELA.^{54,61} O fenótipo bulbar (parésia dominante dos músculos faciais e bulbares) ocorre em cerca de 1/3 dos casos, caracterizado por disartria progressiva, seguida por disfagia e, frequentemente, com labilidade emocional associada. Até 5% dos pacientes têm, como forma inicial da doença, envolvimento respiratório, sendo aqueles frequentemente observados no início dos sintomas pelas especialidades de cardiologia e pneumologia, antes de serem encaminhados para a neurologia.² Este fenótipo caracteriza-se normalmente por dispneia progressiva, com ortopneia, por parésia primária do diafragma.⁶⁴ Nestes casos, os pacientes também podem apresentar perda de peso inexplicável.^{2,65} O fenótipo axial é caracterizado pelo comprometimento predominantemente da musculatura para-vertebral. O fenótipo generalizado não tem uma apresentação inicial em nenhuma região específica, sendo acompanhado de sintomatologia difusa, assimétrica e rapidamente progressiva.^{2,65} A ELA pode afectar todos os músculos voluntários. A observação clínica e *postmortem*, bem como estudos genéticos, demonstram que há considerável variabilidade na expressão fenotípica da ELA resultando em apresentações heterogêneas.⁶¹ Até à fase terminal da doença, a ELA tende a poupar os neurónios que inervam os músculos oculares e esfíncterianos.

A perda de peso é uma marca da doença, mesmo na ausência de disfagia. Vários estudos sugerem que existe um estado hipermetabólico na ELA, embora a fisiopatologia subjacente não seja bem compreendida. Factores de risco cardiovascular (como hiperlipidemia ou obesidade) parecem ter efeitos neuroprotectores,⁶⁶ mas não alteram o desfecho clínico.⁶⁷

O diagnóstico é efectuado com base no exame clínico, em conjunto com a electromiografia, para confirmar a extensão da desinervação. Testes laboratoriais e exames de imagem versam, sobretudo, descartar outras entidades que possam se assemelhar a ELA.^{60,61,68} A rápida progressão dos sintomas e sinais suportam o diagnóstico da doença.⁶⁹

Actualmente, sendo a ELA considerada uma degeneração multissistémica, sintomas não-motores são valorizados, embora, geralmente, não dominem o quadro clínico.⁷⁰ Para além do sistema motor, a disfunção cognitiva (principalmente

alterações comportamentais e executivas) é uma manifestação frequente e importante, com implicações no prognóstico.⁷¹⁻⁷³ Como descrito acima, uma proporção significativa de doentes, cerca de 10%-15%, manifestam clinicamente, em associação, a FTD. No entanto, a aplicação de testes sensíveis, como a avaliação neuropsicológica, permite revelar que cerca de 50- 60% dos doentes ELA têm sinais subclínicos de envolvimento cognitivo.⁷⁴⁻⁷⁶

A gravidade e a progressão da ELA podem ser avaliadas por vários métodos, como por exemplo: como a escala MRC (*Medical Research Council*) da força muscular, avaliação quantitativa da força muscular de *Tufts* (TQNE), a escala funcional de *Norris*, a escala funcional de *Appel*, a avaliação neurofisiológica como as técnicas de estimativa do número de unidades motoras ou o índice neurofisiológico, e testes da capacidade ventilatória como a FVC ou as pressões máximas. A maioria dos autores estimam a progressão da doença com a utilização da escala funcional denominada de “Escala de Avaliação Funcional da ELA-revista” (ALSFRS-R, ver tabela em secção de anexos)⁷⁷, cujo valor tem sólido significado prognóstico.

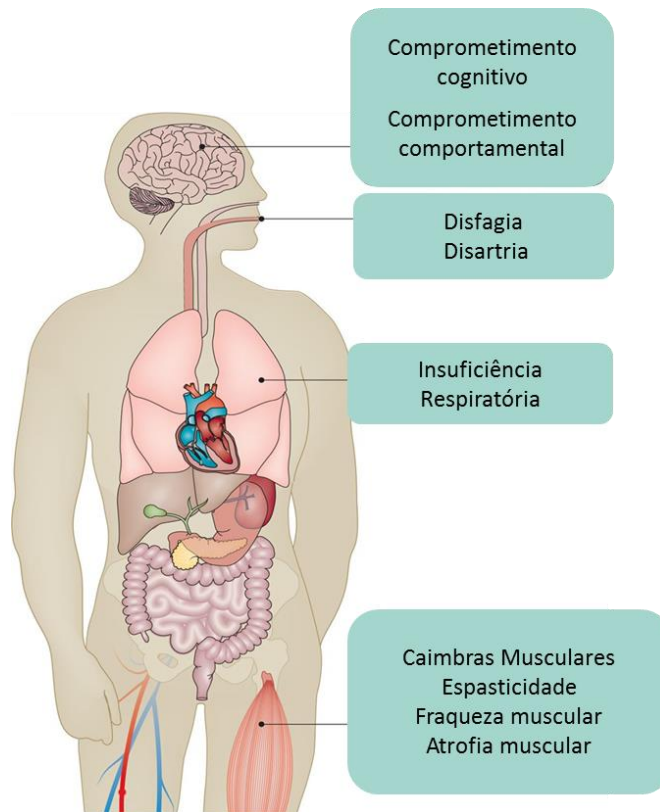


Figura 4 |Manifestações clínicas da ELA.

Embora as manifestações motoras, como a parésia de um membro e a disartria sejam, as principais manifestações clínicas da ELA, muitos doentes apresentam sintomas não-motores, tais como o comprometimento cognitivo.

Adaptado de *Hardiman et al.*(2017).⁶²

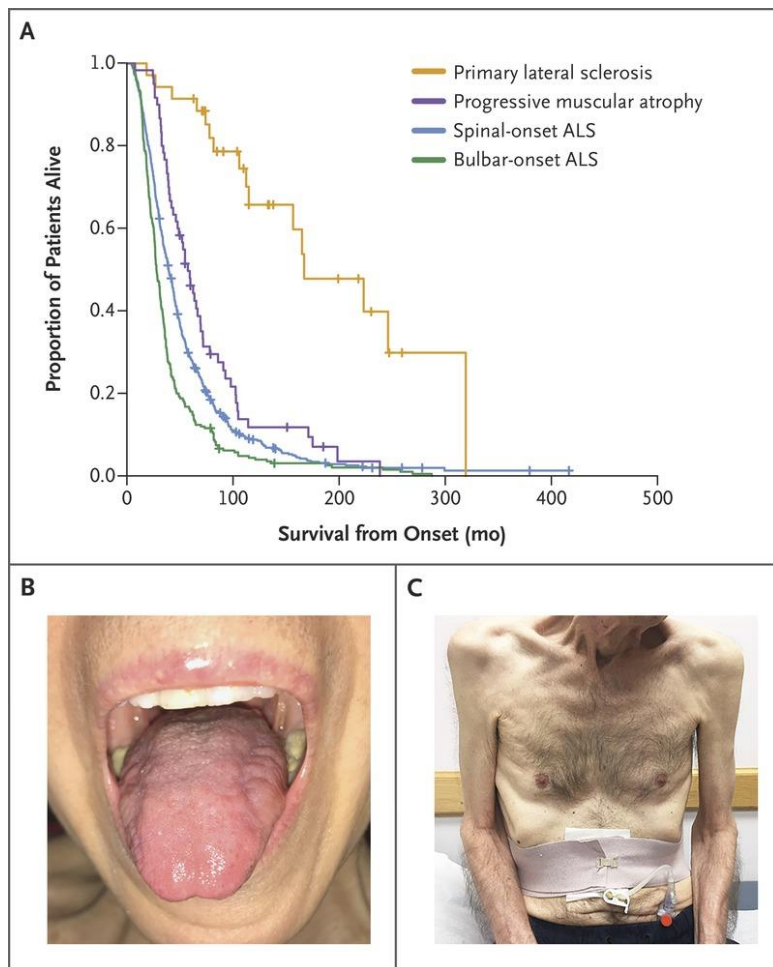


Figura 5 | Fenótipo e Sobrevida na Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA).

A-Curvas de sobrevida para dois tipos de ELA (início medular e início bulbar) e duas outras doenças do neurónio motor (a esclerose lateral primária e a atrofia muscular progressiva). **B**-Atrofia lateral e sulcos na língua de um paciente com ELA, o que reflecte o envolvimento dos neurónios motores bulbares. **C**-Marcada atrofia dos membros superiores e cintura escapular, típico do síndrome do “*Flail arm*”, apresentação associada a um melhor prognóstico. Adaptado de Brown, R. H., & Al-Chalabi, A. *et al.* (2017).⁶¹

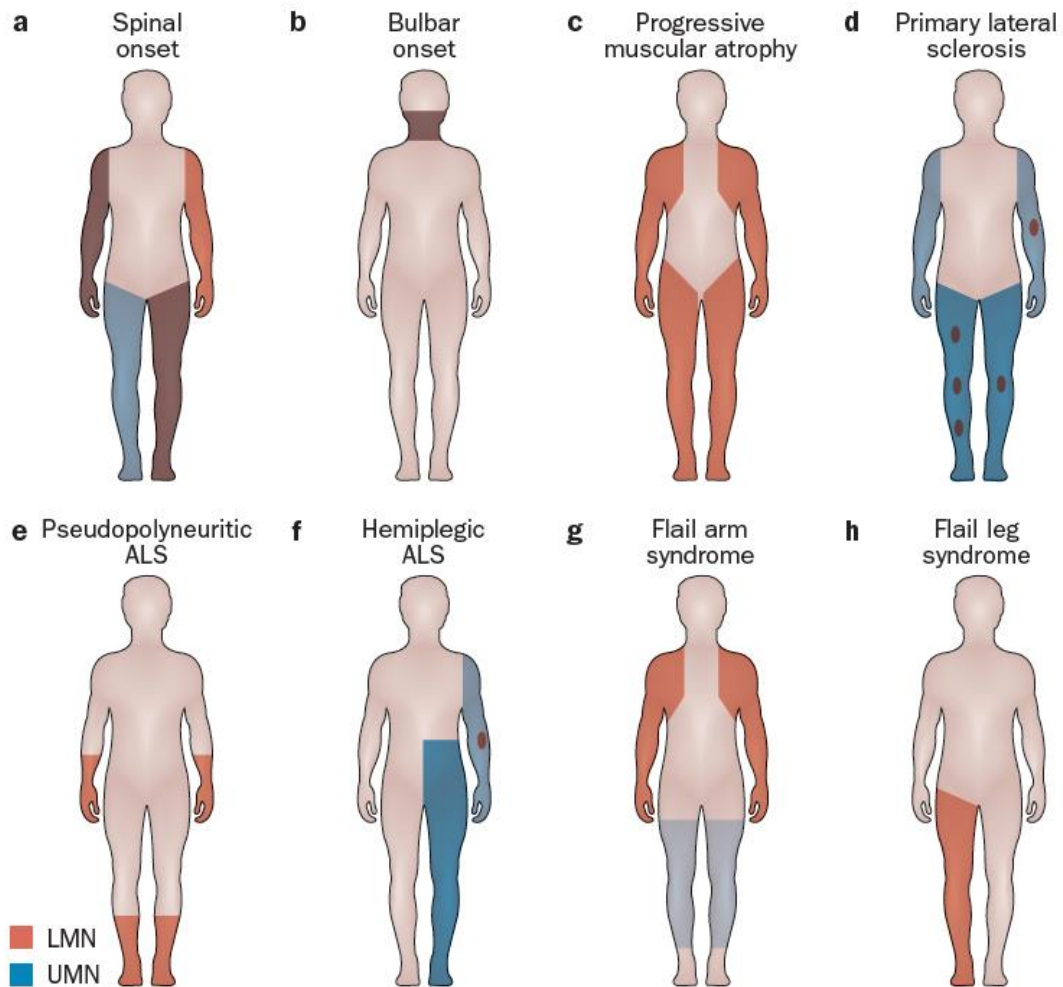


Figura 6| Padrão de envolvimento motor em diferentes fenótipos de ELA.

A vermelho indica o envolvimento do segundo neurónio motor (LMN), a azul indica envolvimento do primeiro neurónio motor (UMN). A sombreado mais escuro indica envolvimento mais grave. **a|**Na ELA, de início medular, o envolvimento variável de UMN e LMN é observado em todos os membros. **b|**Em ELA de início bulbar, o envolvimento do UMN e LMN é observado nos músculos bulbares. **c|**Na atrofia muscular progressiva, os LMNs estão envolvidos nos membros superiores e inferiores. **d|**Na esclerose lateral primária, os UMN dos membros superiores e inferiores estão primariamente envolvidos, mas mais tarde na doença, o envolvimento discreto do LMN pode ser detectado. **e|** Na ELA pseudopolineurítica, apenas os LMNs restrictos aos segmentos distais estão envolvidos. **f|**Na ELA hemiplégica, o envolvimento unilateral do UMN com a preservação da face e, às vezes, o envolvimento discreto do LMN, pode ser observado. **g|**Na síndrome do “*flail arm*”, o envolvimento de LMN é restricto aos membros superiores, mas sinais discretos de lesão do UMN podem ser detectados nos membros inferiores. **h|**Na síndrome da “*flail leg*”, o envolvimento do LMN é restricto aos membros inferiores, sendo frequentemente assimétrico. Adaptado de Swinnen, B., & Robberecht, W. *et al.* (2014).⁶⁴

Por muitos anos, os únicos critérios publicados para o diagnóstico da doença eram os derivados de Edward Lambert, com suporte da electroneuromiografia (ENMG).⁷⁸

Em 1990, os critérios de diagnóstico formulados por um Subcomité da Federação Mundial de Neurologia (*World Federation of Neurology* (WFN)) foram publicados, critérios de diagnóstico do *El Escorial*, em 1994.⁷⁹

O diagnóstico ficou definido pela evidência de sinais de lesão do 2º neurónio (através do exame clínico, alterações electrofisiológicas ou neuropatológicas) associados a sinais clínicos de lesão do 1º neurónio, com curso progressivo. Para o diagnóstico, ainda é necessário, a ausência de achados electrofisiológicos e patológicos característicos de outras doenças, bem como alterações na neuroimagem que possam justificar o quadro clínico. De forma a favorecer o diagnóstico mais precoce, em 1998, os critérios diagnósticos em *El Escorial* foram reformulados, numa reunião da WFN, em Airlie House, Warrenton, Virgínia, EUA. O documento revisto, conhecido como *El Escorial Revised*, foi publicado pela WFN-ALS, com o objectivo de padronizar o diagnóstico para estudos e ensaios clínicos.⁷⁹ No entanto, a inclusão de doentes com doença provável e definitiva, de acordo com os critérios do *El Escorial-Revised*, pode ser discutida como restrictiva.^{2,80} Além disso, esses critérios podem ser mal compreendidos, particularmente nos estadios iniciais da ELA, quando os doentes estão mais propensos ao benefício de uma intervenção terapêutica.^{2,81} Assim, em 2006, numa reunião, realizada no Japão, os peritos melhoraram os critérios diagnósticos electrofisiológicos e formularam os "Critérios de *Awaji*". Nestes critérios foram indicados um conjunto de normas de forma a potenciar a sensibilidade diagnóstica.^{82,84}

Tabela 1| Critérios do *El Escorial*, *Airlie House* (*El Escorial* revisto) e de *Awaji-Shima* para o diagnóstico de ELA

A presença de:

- (a) Evidência de degeneração do segundo neurónio (LMN) por exame clínico, electrofisiológico e exame neuropatológico;
- (b) Evidência de degeneração do primeiro neurónio (UMN) por exame clínico;
- (c) Disseminação progressiva dos sinais e sintomas numa região ou para outras regiões, determinados pela história clínica e exame físico.

A ausência de:

- (a) Evidências electrofisiológicas e patológicas de outros processos patológicos que expliquem os sinais de degeneração de UMN e LMN;
 - (b) Evidências de neuroimagem de outros processos patológicos que possam explicar os sinais clínicos e electrofisiológicos.
-

Categorias de certeza diagnóstica (critérios *El Escorial*)

ELA Definitiva: Sinais do UMN e LMN em três regiões. †

ELA Provável: Sinais de UMN e LMN em pelo menos duas regiões, com alguns sinais de UMN rostral aos sinais LMN.

Possível ELA: Sinais de UMN e LMN em apenas uma região ou sinais de UMN isolados em duas ou mais regiões, ou sinais de LMN rostrais aos sinais de UMN.

ELA suspeita *: Sinais de LMN apenas (em apenas duas ou mais regiões).

Categorias de certeza diagnóstica (critérios de *Airlie House*) (Brooks et al, 2000)

ELA clinicamente definitiva: Sinais de UMN e LMN na região bulbar e pelo menos duas regiões espinhais, ou sinais de UMN em pelo menos duas regiões espinhais e sinais de LMN em três regiões espinhais

ELA clinicamente provável: evidência clínica isolada de sinais de LMN e UMN em pelo menos duas regiões com alguns sinais do UMN rostral aos sinais LMN.

ELA clinicamente provável - suportada em laboratório: sinais clínicos de distúrbios motores de disfunção neuronal em apenas uma região, ou sinais de UMN isolados numa região com sinais de LMN definidos por critérios de electromiografia em pelo menos duas regiões, juntamente com a aplicação adequada de neuroimagem e protocolos clínicos laboratoriais para excluir outras causas.

ELA Possível: Sinais de UMN e LMN em apenas uma região, ou sinais de UMN isolados em duas ou mais regiões, ou sinais de LMN rostrais aos sinais de UMN, e o diagnóstico de sinais clínicos de ELA provável suportado por laboratório não pode ser comprovado.

* Esta categoria foi eliminada dos critérios do *El Escorial* revistos.

Categorias de certeza diagnóstica (critérios de *Awaji-Shima* (2008))

ELA Definitiva: Evidência clínica ou electrofisiológica de sinais de UMN e LMN na região bulbar e pelo menos duas regiões/segmentos espinhais, ou a presença de sinais de envolvimento do UMN e LMN em três regiões espinhais

ELA Provável Evidência clínica ou electrofisiológica de sinais de UMN e LMN em pelo menos duas regiões, com manifestações clínicas de UMN necessariamente rostrais aos sinais de LMN

ELA Possível: Evidência clínica ou electrofisiológica de sinais de UMN e LMN em apenas uma região, ou sinais de UMN isolados em duas ou mais regiões, ou sinais de LMN detectados em posição rostral aos do UMN.

Exclusão de outros diagnósticos através de estudos de imagem e laboratoriais.

** Neuroimagem e estudos clínicos laboratoriais devem ser feitos para excluir diagnósticos alternativos. † Regiões: bulbar, cervical (correspondente ao pescoço, membros superiores, e diafragma), torácica (correspondendo aos músculos das dorsais e do abdómen) e lombar (correspondendo aos membros inferiores). ^{79,83,84}

LMN = 2º Neurónio. **UMN** = 1º Neurónio.

Sinais de UMN: Clónus, sinal de Babinski, espasticidade, reflexos vivos, reflexos abdominais ausentes

Sinais LMN: Parésia, atrofia muscular, fasciculações: electromiografia para identificar desinervação activa e reinervação, ou fasciculações e reinervação (*Awaji*).

Vários factores clínicos e demográficos têm sido identificados como preditores da progressão na ELA: maior idade no início da doença, início bulbar, curto tempo entre os primeiros sintomas e o diagnóstico, compromisso respiratório, presença de defeito cognitivo, rápido declínio respiratório ou funcional e a mutação *C9orf72*, são factores de mau prognóstico.⁸⁵⁻⁸⁷

1.2.4. Epidemiologia

Na Europa e nos Estados Unidos, a incidência da doença é de cerca de 2-3 por cada 100.000 pessoas, em cada ano, sendo a prevalência estimada algo variável entre 5-8/100.000 pessoas ou mais. A prevalência e a incidência da ELA aumentam com a idade.⁵⁴ Um estudo recente, em Portugal, reporta um aumento da prevalência de 6.7/100.000 habitantes em 2009, para 10.3/100.000 em 2016.^{88,89} O início dos primeiros sintomas é mais frequente entre os 50 e os 65 anos.^{76,90-92} Os pacientes com história familiar tendem a ter um início da doença mais precoce.⁷³ A incidência aumenta com a idade (pico entre 70-79 anos). A ELA de início juvenil é um termo utilizado quando a idade de início é inferior aos 25 anos.⁹³

O sexo masculino apresenta maior risco, com uma razão homem/mulher de 1.5:1.^{94,95} A menor incidência de ELA nas mulheres (existente em idades mais jovens) pode ser explicada por uma possível acção protectora das hormonas sexuais femininas.⁹⁶ A esperança média de vida é de cerca de 30 meses após os primeiros sintomas.^{87,91,97} Registos populacionais evidenciaram que até 70% dos pacientes com ELA morrem no intervalo de 3 anos após o início dos primeiros sintomas e aproximadamente 10% podem sobreviver por mais de 8 anos.^{11,87} As formas familiares têm tendência para uma sobrevida mais curta.⁶²

A maioria dos homens têm a doença de início medular, no entanto a forma bulbar predomina nas mulheres com início mais tardio da doença. A idade inicial da doença tende a ser mais precoce na Ásia e na América do Sul.

Foram descritos focos geográficos (Pacífico Ocidental, principalmente em Guam e na Península de Kii da Ilha de Honshu, no Japão),⁹⁸⁻¹⁰⁰ com uma prevalência 50 a 100 vezes maior do que em outras partes do mundo.^{98,101-103} Estas populações incluem o povo Chamorro das ilhas Guam e Marianas e os povos Auyu e Jakai do sudoeste da Nova Guiné, nos quais a ELA está associada ao parkinsonismo e demência, complexo ELA parkinson-demência (complexo ELA/PDC). A causa desta associação permanece indefinida. Pensa-se que o aumento da incidência da

ELA nestas regiões esteja associada a factores ambientais, especialmente a um aminoácido não proteico, neurotóxico, β -metilamino-L-alanina (*BMAA- β -methylamino-L-alanine*) presente nas sementes da *Cycas micronesica* (uma espécie de cicadófito do género *Cycas* da família *Cycadaceae*) ou devido à acção tóxica de uma cianobactéria simbiótica das raízes da cicadófito.^{101,104,105} A prevalência tem sido decrescente nas últimas décadas.^{102,103,106-108}

1.2.5. Abordagem Terapêutica

Nenhuma terapia farmacológica oferece um benefício clínico substancial para os pacientes com ELA. O medicamento Riluzol¹⁰⁹ está no mercado há mais de 20 anos e condiciona um modesto aumento da sobrevida, a edaravona¹¹⁰ é um outro medicamento, recente, sem aprovação pela Agência Europeia do Medicamento (EMA), mas com aprovação condicional pela *Food and Drug Administration* (FDA), com discutível impacto transitório, muito ligeiro, no declínio funcional.^{61,110,111} O Riluzol deve ser iniciado em estadios iniciais da doença por apresentar maior eficácia nestas fases da doença.^{112,113}

O Riluzol actua ao nível da excitotoxicidade induzida pelo glutamato,¹¹⁸ enquanto que a edaravona suprime o stress oxidativo. O efeito neuroprotector preciso do Riluzol ainda é uma questão de debate, mas sabe-se que pode interferir com os canais persistentes de sódio da membrana celular e estimular a produção de factores tróficos pelas células da glia.

A ventilação não-invasiva tem um papel de grande impacto na melhoria de qualidade de vida e sobrevida dos doentes. Sendo que o impacto no aumento da sobrevida tem maior efeito que o do Riluzol.^{114,119} Outros meios de reabilitação respiratória como a tosse assistida são cruciais, na melhoria da qualidade de vida e redução dos riscos de infecção respiratória.

A gastrostomia é outra intervenção relevante, quando oportuna, permitindo melhorar a qualidade de vida dos doentes e seus cuidadores, assim como reduzir o risco de pneumonia por aspiração e de severa perda de peso, com incerto impacto na sobrevida.

O controlo sintomático e a optimização da qualidade vida, por parte de uma equipa multidisciplinar, estão associados, de igual forma, ao aumento da sobrevida e qualidade de vida dos pacientes.^{2,115} Importa considerar aspectos como o controlo das secreções, da dor, da espasticidade e de outros. O apoio de uma equipa de

cuidados ventilatórios e de reabilitação, com a inclusão de pneumologistas, fisiatras, fisioterapeutas, terapêutas ocupacionais, terapêutas da fala, é um componente essencial do tratamento.^{62,84,116,117}

Na ausência de tratamentos farmacológicos eficazes, as intervenções sintomáticas e os cuidados de suporte continuam a ser a pedra angular no seguimento de doentes com ELA.^{62,118-120}

1.3. FACTORES DE RISCO PARA A ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA

1.3.1. Visão Geral dos Factores de Risco para a ELA

Embora inúmeros tenham sido propostos, os únicos factores de risco estabelecidos para a doença são idade avançada, sexo masculino e história familiar de ELA.¹²¹ No entanto, uma compreensão da contribuição ambiental para a ELA é essencial, já que este é o único componente de risco facilmente modificável. Os três principais obstáculos para essa pesquisa são a natureza das exposições ao risco ambiental, o desenho do estudo para exposições que se acumulam ao longo da vida e a dificuldade na obtenção de fundos para efectuar estas investigações.⁹⁴ No entanto, à medida que os factores genéticos são identificados, e as vias metabólicas se tornam mais claras, os possíveis factores ambientais a serem testados podem tornar-se mais evidentes. Ainda não foi identificado nenhum factor de risco ambiental, de grande efeito, possivelmente porque a contribuição de qualquer exposição a um risco isolado é pequena.⁹⁴

Nesta tese, irá focar-se, de forma breve, os factores de risco, nomeadamente factores genéticos e factores ambientais, mais estudados na ELA.

1.3.2. Factores Genéticos

A maioria dos casos de ELA, são denominados de “ELA esporádica”(SALS), mas alguns são classificados como "ELA familiar" (FALS), devido à presença de outros casos da doença na mesma família. A FALS ocorre devido a mutações em *locus* genéticos específicos.^{76,122} Na ELA, o padrão de transmissão segue um padrão mendeliano autossómico dominante.^{2,4,123}

Mais de 30 variantes genéticas foram patologicamente ligadas à ELA, praticamente, qualquer mutação representa um novo biomarcador genético, que pode ser

explorado para fins de diagnóstico.¹²⁴ Três genes (*C9orf72*, *SOD1* e *TARDBP*) são responsáveis por 70% de todos os casos monogénicos. O gene *C9orf72* está localizado no cromossoma 9 e a mutação nesse gene mostrou-se presente tanto na ELA quanto na FTD, em doentes europeus, americanos e japoneses,^{4,103} sendo a causa genética mais comum tanto na FALS (41% dos casos), como nos casos de SALS (5%).^{125,126} A segunda causa mais comum de FALS (15%) são as mutações na superóxido dismutase 1 (*SOD1*), mas representam apenas uma fracção menor (~ 1%) dos casos da SALS. O gene *FUS* e *TARBDP* são responsáveis por 1-5% das mutações da ELA. A identificação de um gene relacionado com a ELA tem também importantes implicações diagnósticas.^{11,125,126}

O nosso grupo, analisou os genes *C9orf72* e *SOD1* numa grande população de doentes portugueses com ELA e foram registadas as características clínicas e demográficas dos mesmos. A FALS constitui 12% da população. Mutações nos genes da *SOD1* e da *C9orf72* foram encontradas em 9 % da população, representando 40% dos casos de FALS e 5% dos casos de SALS. As mutações no gene *SOD1* foram raras (<1%). Este nosso estudo reitera que a arquitectura genética da ELA varia entre diferentes regiões geográficas.⁹

Os estudos em família e de gémeos são ferramentas poderosas para identificar o impacto do componente hereditário.¹⁰³ Vários estudos descobriram que as famílias com pacientes com ELA tinham três vezes¹²⁷ a dez vezes maior risco¹²⁸ de ELA. Reunindo vários registos de gémeos do Reino Unido e Suécia, estima-se que a hereditariedade acrescente um risco de 61% para o desenvolvimento da doença.¹²⁹

O conhecimento dos genes envolvidos, pode ser usada para:

- 1- Diagnóstico clínico (confirmação pela identificação da mutação causal);
- 2- Identificação de variantes de risco e modificadores de doença (por exemplo, *EPHA4*);
- 3- Compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à doença;
- 4- Estratificação de pacientes com ELA para melhor delinear estratégias terapêuticas e ensaios clínicos.

Actualmente, existem dois bancos de dados *on-line* que compreendem um resumo actualizado de factores genéticos relacionados à ELA, o banco de dados *on-line* de esclerose lateral amiotrófica (*online database of amyotrophic lateral sclerosis-*

ALSOD; <http://alsod.iop.kcl.ac.uk>) e o banco de dados dos genes da ELA (*Amyotrophic Lateral Sclerosis gene database. ALSGene*; <http://www.alsgene.org>). Existem dois procedimentos principais para a identificação/triagem de novas variantes patogénicas associadas à ELA, o *genome-wide association studies (GWAS)* e o *Whole-exome sequencing (WES)*.

Alguns desses genes não estão relacionados apenas com a ELA, mas também a outras doenças. Nesta tese serão brevemente abordados apenas os genes mais importantes.

A Tabela 2 resume os genes que foram ligados ao desenvolvimento de ELA e *loci* de FTDALS.

Tabela 2 | Visão geral das principais informações disponíveis para ELA e *loci* FTDALS.

Adaptado de Chia *et al.* (2018), Nguyen *et al.* (2018) e Pampalakis *et al.* (2019). ^{126,130,131}

Gene/Tipo de ELA/Ano	Locus/Localização citogenética	Nome da Proteína	Herança	Função	Referências
SOD1 (ALS1) 1993	21q22.1	<i>Cu/Zn Superoxide Dismutase</i>	AD, AR, DN	SOD1: desintoxicação de radicais livres citosólicos <i>Proteostasis</i>	Bowling, Schulz, Brown, & Beal, 1993 ¹³²
Alsin (ALS2) 2001	2q33.1	<i>Alsin</i>	AR	Nenhuma função conhecida, presente no lado citosólico dos endossomas neuronais	Hadano et al, Yang <i>et al</i> , 2001 ¹³³
(ALS3)	18q21	<i>Unknown</i>	AD	Desconhecida	Hand <i>et al</i> , 2002 ¹³⁴
SETX (ALS4) 1998	9q34.13	<i>Senataxin</i>	AD	Actividade helicase DNA/RNA; Metabolismo DNA/RNA	Chance <i>et al</i> , 1998 ¹³⁵
SPG11 (SPG115) (ALS5) 2010	15q21.1	<i>Spatacsin</i>	AR	Papel na plasticidade das neurites, mantendo a estabilidade do citoesqueleto, regulação do transporte vesicular sináptico	Chio <i>et al</i> , 2010 ¹³⁶
FUS (ALS6) 2009	16p11.2	<i>Fused in sarcoma</i>	AD, AR, DN	FUS: transcrição, regulação de splicing, biogénese de RNA, formação de grânulos de Stress <i>Ribostasis</i>	Vance <i>et al</i> , 2009 ¹³⁷
(ALS7)	20p12	<i>Unknown</i>	AD	Desconhecido	Saap <i>et al</i> , 2003 ¹³⁸

VAPB (ALS8) 2004	20q13.3	<i>Vesicle-associated membrane protein-associated protein B</i>	AD	VAPB: transporte vesicular e eliminação de proteínas de conformação anormais (via PRU); controlo do metabolismo lipídico e transferência lipídica entre retículo endoplasmático e organelos	Nishimura <i>et al</i> , 2004 ¹³⁹
ANG (ALS9) 2006	14q11	<i>Angiogenin</i>	AD, FR	Factor angiogénico e factor trófico para neurónios motores. Angiogénese	Greenwaay <i>et al</i> , 2006 ¹⁴⁰
TARDP-43 (ALS 10) 2008	1q36.22	<i>Transactive Response DNA/ RNA-binding protein</i>	AD, AR, DN	Proteína TAR de ligação ao DNA (TDP-43): transcrição, <i>splicing</i> , transporte de mRNAs	Ribostasis Sreedharan <i>et al</i> , 2008 ¹⁴¹
FIG4 (ALS11) 2009	6q21	<i>Phosphoinositide 5-phosphatase</i>	AD	Regulação da concentração celular de PI (3,5) P2 que modula o transporte retrógrado de vesículas endoplasmáticas para o golgi, regulação da autofagia	Chow <i>et al</i> , 2009 ¹⁴²
OPTN (ALS12) 2010	10p13	<i>Optineurin</i>	AD, AR	Optineurina: morfogénese celular, transporte de membrana, vesicular, activação da transcrição, autofagia e neuroinflamação	Maruyama <i>et al</i> , 2010 ¹⁴³
ATXN2 (ALS13) 2010	12q24	<i>Ataxin 2</i>	AD, FR	Interação com o TDP-43	Ribostasis Elden <i>et al</i> , 2010 ¹⁴⁴
VCP (ALS14) 2010	9p13.3	<i>Valosin-containing protein</i>	AD, DN	Proteína contendo valosina (VCP): transporte vesicular de ATP	<i>Proteostasis</i> Johnson <i>et al</i> , 2010 ¹⁴⁵
UBQLN2 (ALS15) 2011	Xp11.21	<i>Ubiquilin 2</i>	X-linked AD	Ubiquilina 2: degradação proteica	<i>Proteostasis</i> Deng <i>et al</i> , 2011 ¹⁴⁶

SIGMAR1 (ALS16) 2011	9p13.3	<i>Sigma Receptor 1 Sigma non-opioid intracellular receptor 1</i>	AD	Neuroprotector receptor da membrana Transporte lipídico através do RE, Sinalização do BDNF e EGF	Al-Saif, A., Al-Mohanna, F., Bohlega, S, 2011 ¹⁴⁷
CHMP2B (ALS17) 2006	3p11.2	<i>Charged Multivesicular body protein 2B</i>	AD	Formação de corpos multivesiculares (MVB) e saída de proteínas de carga endossomal em MVBs	Parkinson, <i>et al</i> , 2006 ¹⁴⁸
PFN1 (ALS18) 2012	17p13.2	<i>Profilin 1</i>	AD	Conversão de actina monomérica (G) em actina filamentosa (F)	Wu <i>et al</i> , 2012 ¹⁴⁹
ERBB4 (ALS19) 2013	2q34	<i>Receptor protein kinase erb4</i>	AD	Receptor da proteína tirosina- quinase erbB-4: receptor para neuregulinas e membros da família EGF, regulação do desenvolvimento do sistema nervoso central, transcrição, proliferação celular, diferenciação, migração e apoptose	Takahashi <i>et al</i> , 2013 ¹⁵⁰
HNRNPA1 (ALS20) 2013	12q13.13	<i>Heterogeneous nuclear ribonuclear protein A1</i>	AD, DN	Metabolismo do RNA. Transporte de RNAs do núcleo para o citoplasma, modulação do <i>splicing</i>	Kim <i>et al</i> , 2013 ¹⁵¹
MATR3 (ALS21) 2014	5q31.2	<i>Matrin 3</i>	AD	Transcrição, retenção nuclear de RNAs anómalos, regulação da resposta do sistema imunitário inacto mediada por vírus DNA	Johnson <i>et al</i> , 2014 ¹⁵²
TUBA4A 2014	2q35	<i>Tubulin alpha 4a</i>	AD	Principal componente dos microtúbulos; célula do esqueleto neuronal	Smith <i>et al</i> , 2014 ¹⁵³
ANXA11 2017	10q22.3	<i>Annexin A11</i>	AD	<i>Proteostasis</i>	Smith <i>et al</i> , 2017 ¹⁵³

NEK1 2016	10q22.3	<i>NIMA Related Kinase 1</i>	AD, AR	Organização do citoesqueleto, dano DNA e ciclo celular, regulação da membrana mitocondrial	Kenna <i>et al</i> 2016 ¹⁵⁴
KIF5A 2018	12q13.3	<i>kinesin family member 5A</i>	AD	Transporte mitocondrial	Nicolas <i>et al.</i> 2018 ¹⁵⁵ Brenner <i>et al.</i> 2018 ¹⁵⁶
C9ORF72 (FTDALS1) 2011	9p21.2	<i>Chromosome 9 open reading frame 72</i>	AD	Troca de nucleótidos de guanina <i>C9orf72</i> : ligação de RNA, regulação de autofagia, <i>proteostasis</i> , alterações globais no RNA, transporte nucleocitoplasmático	Renton <i>et al</i> , 2011 ⁸ DeJesus-Hernandez <i>et al</i> , 2011 ⁷
CHCHD10 (FTDALS2) 2014	22q11.23	<i>coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10</i>	AD	Proteína 10 contendo domínio espiral enrolada em espiral-espiral-hélice: mantém organização mitocondrial e estrutura dos sulcos mitocondriais	Bannwarth <i>et al</i> , 2014 ¹⁵⁷
SQSTM1 (FTDALS3)	5q35.3	<i>Sequestosoma 1; p62</i>	AD	Autofagia (formação autofágica e degradação de inclusões citoplasmáticas contendo proteínas ubiquitiniladas)	Fecto <i>et al.</i> 2011 ¹⁵⁸
TBK1 (FTDALS4) 2015	12q14.2	<i>Tank-binding kinase 1</i>	AD, DN	Regula a autofagia e neuroinflamação	Cirulli <i>et al.</i> 2015 ¹⁵⁹
CCNF 2016	16p13.3	<i>cyclin F</i>	AD	<i>Proteostasis</i>	Williams <i>et al</i> 2016 ¹⁶⁰
hnRNPA2B1 2013	7p15.2	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1</i>	AD, FR	<i>Ribostasis</i> Empacotamento e transporte do RNAm, biogene do <i>microRNA</i>	Kim <i>et al.</i> 2013 ¹⁵¹
ELP3 2008	8p21	<i>Elongator complex protein 3</i>	indefenido	Envolvimento no alongamento transcricional, <i>ribostasis</i> , integridade citoesqueleto	Simpson <i>et al</i> , 2008 ¹⁶¹
NEFH 1994	22q12	<i>Neurofilament heavy polypeptide</i>	AD, FR	Mantém o calibre neural, transporte axonal	Figlewicz <i>et al.</i> , 1994 ¹⁶²

DCTN1 2003	2p13	<i>Dynactin subunit 1</i>	AD, FR	Associação com dineína proporcionando transporte retrógrado axonal	Puls <i>et al</i> , 2003 ¹⁶³
ATXN2 2010	12q24.11	<i>D-amino- oxidase acid</i>	AD, FR	Regulação dos níveis neuromoduladores da D-serina no cérebro, contribuição para a síntese de dopamina, eliminação de D-aminoácidos acumulados durante o envelhecimento	Mitchell <i>et al</i> , 2010 ¹⁶⁴
TAF15 2011	17q11	<i>TATA-binding protein-associated factor 2N</i>	AD, FR	Iniciação da Transcrição: Componente do gene RNA polimerase II	Couthouis <i>et al</i> , 2011 ¹⁶⁵
GLE1 2014	9q34.11	<i>Nucleoporin GLE1</i>	AD	Proteína de processamento do DNA, RNA	Kaneb <i>et al</i> , 2015 ¹⁶⁶
C21orf2 (CFAP410) 2016	21q22.3	<i>Cilia and flagellaassociated protein 410</i>	AD, FR	Organização do citoesqueleto	Van Rheenen <i>et al</i> , 2016 ¹⁶⁷
TIA1 2017	2p13.3	<i>T-cell intracellular antigen 1</i>	AD	Metabolismo RNA	Mackenzie <i>et al</i> . 2017 ¹⁶⁸

Legenda da tabela: ELA|Esclerose Lateral Amiotrófica; AD|Autossômico dominante; AR|Autossômico recessivo; DN| *de novo*; FR|Factor de Risco; XL|Ligado ao X; NR| Não reportado; NA| não aplicável; BDNF| Factor Neurotrófico Derivado do Cérebro; EGF| Factor de crescimento epidérmico; RNAm| RNA mensageiro

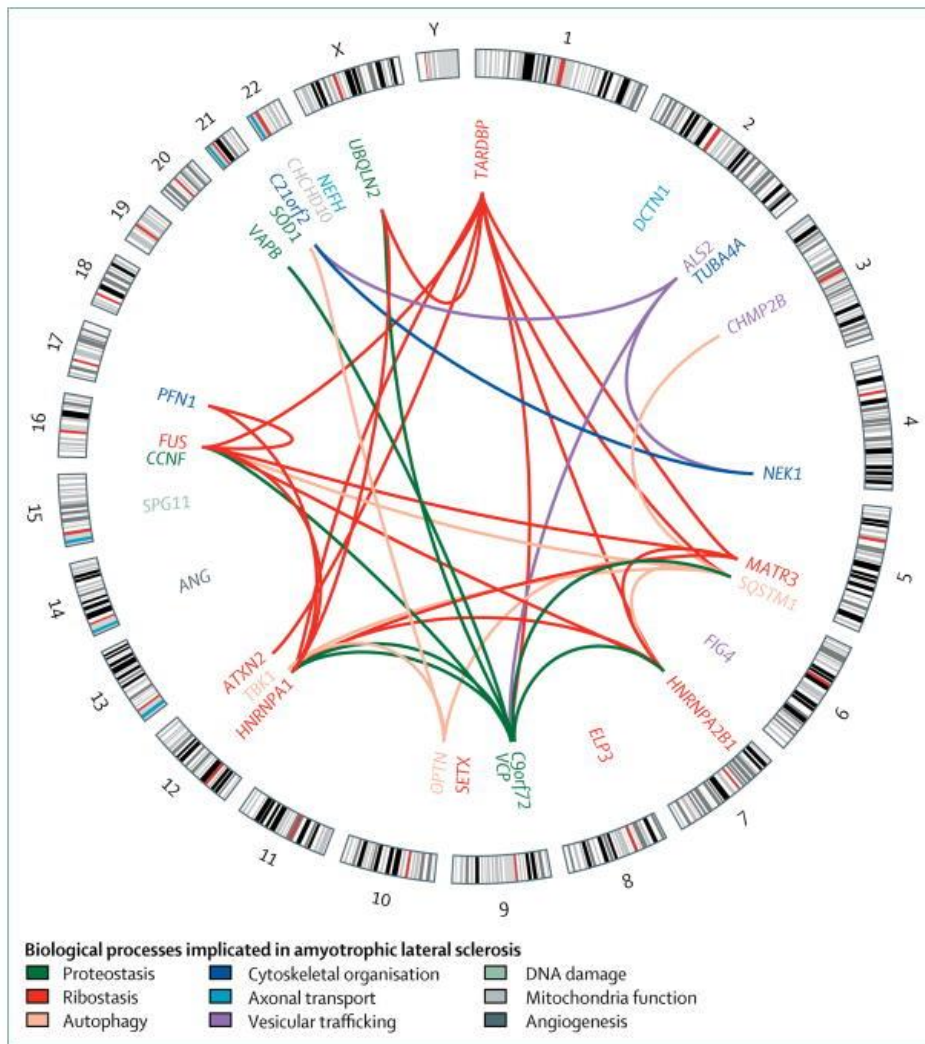


Figura 7| Interações entre genes associados à Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA).

O círculo externo é um ideograma cariotípico que mostra os 24 cromossomas (22 cromossomas autossómicos, cromossoma X e cromossoma Y); o círculo interno mostra a localização de cada gene. Ligações entre genes representam interações no nível da proteína ou do gene. Os dados de interação foram obtidos do *Biological General Repository for Interaction Datasets*. Linhas pretas indicam padrões de bandas citogenéticas. Os processos biológicos implicados no gene ou nas interações são indicados pela cor. Adaptado de Chio *et al.* (2018).¹³⁰

A figura 8, representa a frequência das mutações (volume) e os genes descritos como associados à ELA, e o respectivo ano em que foi identificado.

Genes na ELA e Frequência

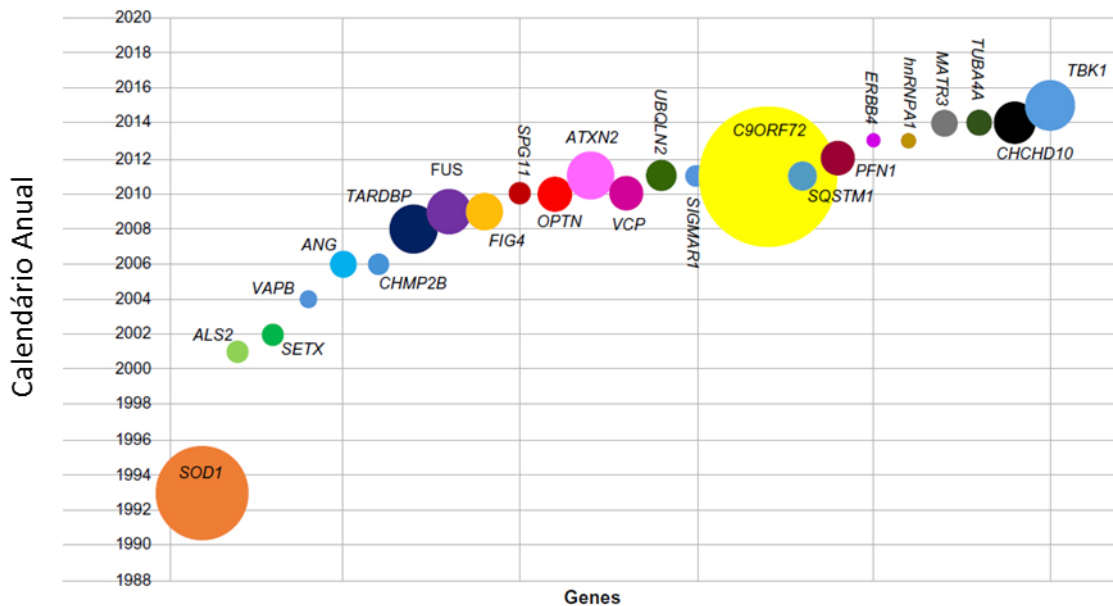


Figura 8|Frequência de genes na ELA.

Cada gene é traçado de acordo com o ano em que foi encontrado; o tamanho dos círculos significa a frequência de mutações em FALS ou ELA, como reportado na literatura. Onde as frequências dos genes não estavam disponíveis, estas receberam um tamanho de círculo equivalente a 1%, para fins ilustrativos. Adaptado de Alsultan *et al.* (2016).¹⁶⁹
 Legenda da figura: ELA| esclerose lateral amiotrófica; FALS|ELA familiar.

Superóxido Dismutase 1 (SOD1)

Em 1993, foi identificada uma mutação *missense*, dominante do gene SOD1,¹⁷⁰ sendo o primeiro gene a ser associado à FALS.^{5,171} Até hoje, mais de 150 mutações deste gene foram identificadas em todos os seus 5 exões.

A mutação SOD1 humana parece apresentar uma patologia distinta das outras formas de ELA, devido à ausência de TDP-43 e/ou FUS nos aglomerados intracelulares, tal como observado em outras mutações, incluindo nos casos com a expansão do gene *C9orf72*.^{5,172}

Internacionalmente, é responsável por até cerca de 12% dos casos familiares e por cerca de 1% dos casos esporádicos.¹⁷³ Em geral, os doentes têm apresentação medular e a associação com a demência é excepcional.¹⁷¹ No entanto, a análise do genótipo SOD1 reflecte fenótipos clínicos variáveis, demonstrando que o fenótipo é modificado por factores genéticos e ambientais.^{143,171} A mutação SOD1^{A4V} (a mutação SOD1 mais comum no norte da Europa) causa uma forma agressiva de doença que normalmente leva à morte dentro de um ano após o início dos sintomas,

e a penetrância da mutação genética é de 91%,^{174,175} enquanto a mutação SOD^{D90A} homozigótica, que é recessiva na população escandinava, está associada a uma sobrevivência prolongada.^{5,175,176} Estes doentes podem manifestar perturbação cognitiva nos últimos estadios da doença.^{5,177}

Proteína TAR de Ligação ao DNA de 43-kDa (TARDBP)

O gene TARDBP, localizado no cromossoma 1p36.22, codifica a proteína TAR de ligação ao DNA de 43kDa (TDP-43).¹⁷⁸

TDP-43 é uma proteína de ligação DNA/RNA, pertence à família de ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas, tem um papel na transcrição génica, regulação do transporte e estabilização do *splicing* e do processamento e estabilização do RNAm, bem como transporte de RNAm para o nucleocitoplasmático.¹⁷⁹⁻¹⁸¹ Para mais, a TDP-43 é um componente universal das inclusões citoplasmáticas ubiquitinadas, observada em amostras de tecido, na glia e neurónios, de pacientes com ELA, e num grupo de doentes com FTD.^{182,163,165} O papel patogénico da TDP-43 na neurodegenerescência ficou evidente em 2006, pela identificação da sua presença nas inclusões ubiquitinadas no cérebro de pacientes com FTD e ELA.^{183,184}

Têm sido identificadas, desde 2008, mutações no gene TARDBP em indivíduos com a SALS e FALS.^{185,186,162,163} Quase todas estas mutações, mais de 40, estão localizadas no exão 6, na região C-terminal rica em glicina envolvida em interações proteína-proteína.¹⁸⁴ As mutações TARDBP são causas incomuns de ELA-FTD (5% dos casos de FALS e <2% dos casos esporádicos),^{141,185} mas na região da Sardenha estas mutações são responsáveis por cerca de 1/3 dos casos.¹⁸⁷

Em 2011, de modo a harmonizar a classificação da patologia FTD-TDP, foi proposta a categorização neuropatológica em 4 grupos (A, B, C, D), o que tem sido consensual.^{188,189}

Não está claro como as mutações TARDBP causam a degeneração dos neurónios motores, se devido à perda da função nuclear ou pela aquisição de uma função tóxica (por agregação).^{189,167}

Gene Fundido em Sarcoma (FUS/TLS)

O gene FUS, localiza-se no cromossoma 16p11.2, codifica a proteína FUS que se liga ao DNA e RNA e está envolvida em diversos processos celulares, tais como a proliferação celular, reparação do DNA, regulação da transcrição ou o transporte do RNA entre os compartimentos intracelulares.¹⁹⁰⁻¹⁹³

A mutação no gene FUS pode ser transmitida através de herança autossómica dominante e autossómica recessiva.¹⁹⁴ Actualmente, mais de 50 mutações FUS foram identificadas, em cerca de 4% casos de FALS e ~ 1% dos casos de SALS.^{171,195} A maioria das mutações localizam-se na região C-terminal e conduz a uma distribuição citoplasmática aberrante. Quanto mais desorganizada esta distribuição, mais precocemente a doença se inicia. Pacientes com mutação FUS são caracterizados por uma grande diversidade de início da doença (26-80 anos). Os pacientes, em geral, não apresentam comprometimento da região bulbar, e na maioria dos casos há um predomínio clínico do envolvimento do LMN.^{137,138,196}

Mutações no gene FUS foram identificadas numa família cabo-verdiana com ELA autossómica recessiva e em muitas britânicas com transmissão autossómica dominante.^{171,197} Mutações FUS foram, ainda, encontradas em pacientes ALS-FTD, assim como em doentes com ELA juvenil e inclusões neuronais basofílicas.^{171,197}

O envolvimento de FUS na neurodegenerescência ficou evidente pela identificação de inclusões citoplasmáticas ubiquitinizadas e FUS positivas no tecido da medula espinhal de doentes afectados e em portadores de mutações no gene FUS,^{137,198} e mesmo em alguns doentes sem mutações no gene FUS.¹⁹⁹ Em alguns casos de FTD apresentavam inclusões *tau*, TDP-43 negativas.^{200,201} Num estudo, utilizando ratos transgénicos que expressam a mutação FUS, observou-se que uma sobre-expressão da mutação FUS causa paralisia progressiva, sugerindo assim que a expressão da FUS mutante promove o desenvolvimento de fenótipos consistentes com a ELA.^{202,203}

Cromossoma 9 Open Reading Frame 72 (C9orf72)

O gene está localizado no locus 9p21 e contém 12 exões.²⁰⁴ Desde 2000, uma ligação genética entre o FTD-ELA e o cromossoma 9q21-q22 é conhecida. Em 2011, um grande avanço foi feito com a descoberta da expansão de repetições de hexanucleótidos GGGGCC (G4C2) na região do primeiro intrão ou promotor do

gene *C9orf72*. Esta descoberta revolucionou a nossa compreensão da ELA e da FTD.^{7,8}

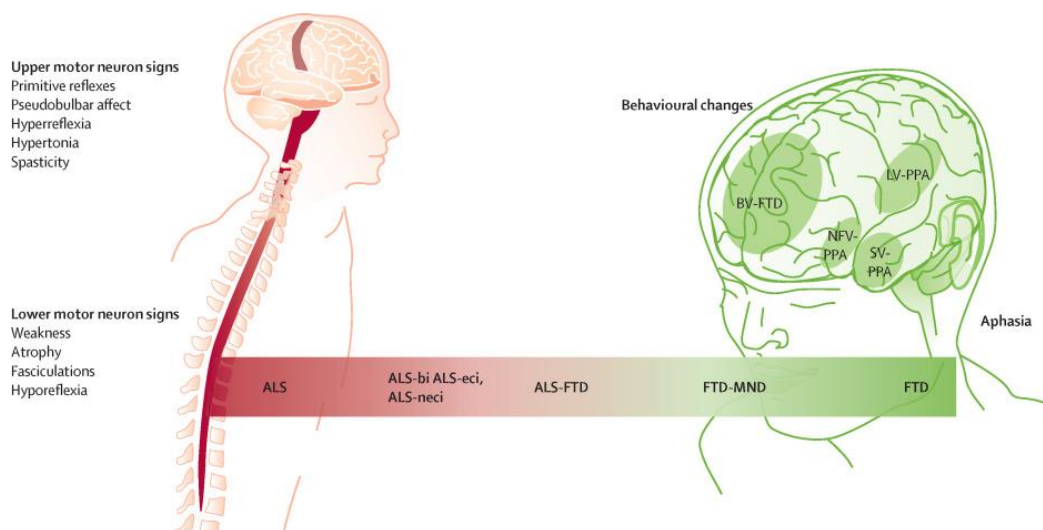


Figura 9| Esclerose lateral amiotrófica e demência fronto-temporal.

Extremos no espectro fenotípico de uma única doença. Adaptado de van Es *et al.* (2017).⁶²

A expansão patológica, G4C2 no gene *C9orf72* é a mutação mais comum nas formas hereditárias de ELA (40%) e FTD (25%)^{5,205,206} e é responsável por cerca de 5-10% dos casos esporádicos de ELA e 5-6% de casos esporádicos de FTD.^{7,189,205}

A idade de início de C9FTD/ELA (termo colectivo utilizado para as doenças associadas a *C9orf72* com características clínicas de FTD, ELA ou ambos) varia entre os 27 a 83 anos de idade e um tempo de sobrevida entre 1 a 22 anos, mas tendendo a condicionar um curso mais rápido. A penetrância desta variante é idade-dependente, sendo estimada < 1% antes dos 35 anos, cerca de 50% pelos 60 anos e de 100% após os 80 anos.^{8,205,207} Pacientes com ELA com mutação *C9orf72* tendem a ter um início mais precoce, compromisso cognitivo e redução da sobrevida, quando comparados a outros pacientes com ELA.²⁰⁸ A frequência relativa dos doentes com início bulbar é mais elevada, situa-se entre os 30 e os 90%, consoante os estudos.²⁰⁹⁻²¹¹

Na população portuguesa, o nosso grupo observou que a expansão repetida do hexanucleótido G4C2 no gene *C9orf72* era responsável por cerca de 5% dos pacientes com ELA esporádica e 38% dos casos de FALS.⁹ Num outro estudo,

efectuado pelo nosso grupo foi demonstrado que a expansão no gene *C9orf72* é um factor preditivo independente do declínio respiratório e da sobrevivência.²¹² Acredita-se que o *C9orf72* esteja envolvido no processamento do RNA, a expansão patológica tem sido associada à produção celular de dipéptidos tóxicos.²¹³⁻²¹⁵ Além disso, evidências recentes implicaram a expansão *C9orf72* na interrupção dos processos de transporte nucleocitoplasmático²¹⁶⁻²¹⁸ e envolvimento na via endolissossômica e no tráfico de vesículas.^{208,219} Três mecanismos foram propostos para a expansão repetida do gene *C9orf72* induzir alterações neurodegenerativas: (1) perda da função de *C9orf72* por haploinsuficiência, (2) ganho de função tóxica devido à geração de RNA aberrante contendo a expansão repetida de hexanucleótidos, e (3) ganho função tóxica através da acumulação de proteínas dipeptídicas.²²⁰ As proteínas dipeptídicas são propensas à agregação.^{213,217,221} Novos avanços sobre os mecanismos patogénicos subjacentes a mutação *C9orf72* parecem sugerir uma sinergia de perda e ganho de função tóxica durante a doença.²²²

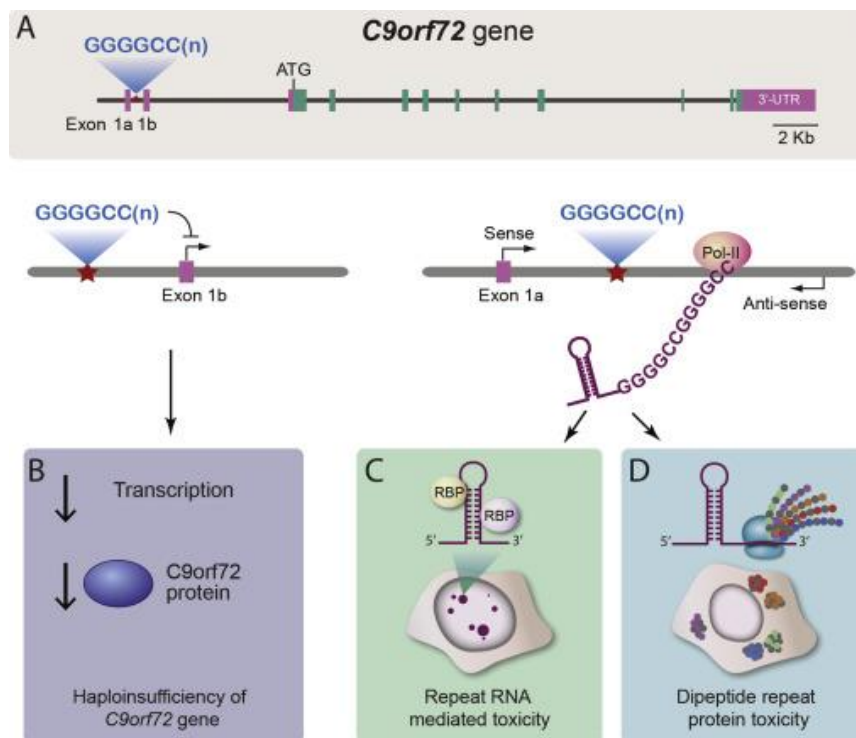


Figura 10| Mutações *C9orf72*: três patomecanismos propostos.

(A) O gene *C9orf72* abriga uma repetição do hexanucleótido polimórfico (GGGGCC-G4C2) em uma região não codificadora do gene. Grandes expansões deste nucleotido repetido, causa C9FTD / ELA. Actualmente, existem três hipóteses principais para explicar

como tais expansões repetidas podem ser patogénicas. (B) A grande expansão de repetição de GGGGCC poderia causar uma regulação negativa na expressão do gene *C9orf72* por interferir com a transcrição, levando a uma diminuição na proteína *C9orf72* e uma perda da função de *C9orf72*. (C) Transcritos de RNA que contêm expansões de repetição *C9orf72* são produzidos por transcrição *sense* e *antisense*, resultam na acumulação de *foci* nucleares ou citoplasmáticos de RNA GGGGCC, bem como o RNA GGGCCC *antisense*, que poderia causar o sequestro de proteínas essenciais de ligação ao RNA (RB), incluindo factores de *splicing*, levando a defeitos no processamento de pré-RNA por um mecanismo de toxicidade do RNA. (D) Os RNAs repetitivos *sense* e *antisense* são substratos para uma forma não convencional de tradução para originar uma série de proteínas de repetição dipeptídica que se acumulam no córtex e medula espinhal de portadores de mutações *C9orf72*, causando doença pela toxicidade da proteína de repetição dipeptídica. Adaptado de Gitler, *et al.* (2016).²²³

A expansão repetida *C9orf72* também foi proposta como uma causa rara de outras doenças neurodegenerativas, incluindo doença de Parkinson, doença de Alzheimer, ataxias, síndrome corticobasal, paralisia supranuclear progressiva e na doença de Creutzfeldt-Jakob.^{224,225}

Tank Binding Kinase 1 (TBK1)

TBK1 é uma quinase que desempenha um papel importante como proteína em múltiplas vias de sinalização,²²⁶ integra sinais a montante de uma variedade de proteínas envolvidas na detecção de organismos patogénicos, inflamação e oncogénese induzida por *Ras* e, por sua vez, modula alvos a jusante, incluindo resposta imunitária/inflamação, autofagia, sinalização de insulina e proliferação/crescimento.²²⁶

O *TBK1* foi identificado pela primeira vez como um gene ligado à ELA, por dois estudos independentes. Cirulli *et al*^{159,227} realizaram sequenciamento do exoma em 2869 pacientes com ELA e 6405 controlos de etnia geneticamente europeia e analisaram variantes usando vários modelos. Este estudo confirmou vários genes previamente conhecidos e identificou o *TBK1*, como um novo gene da ELA.¹⁵⁹

As alterações genéticas no *TBK1* (também conhecidas como NAK ou T2K) foram inicialmente associadas a doenças com componentes neuroinflamatórios conhecidos, incluindo duas formas de glaucoma: glaucoma primário de ângulo aberto e glaucoma de tensão normal. O aumento do número de cópias de *TBK1*, resultando num ganho de função, é reconhecido como uma causa rara destas doenças.²²⁷ *TBK1* é um gene causal associado a 1% de FALS e/ou FTD. Este gene,

na ELA, é conhecido por se ligar e fosforilar proteínas relacionadas com a ELA, tais como a OPTN e a p62 (SQSTM1/sequestosoma).^{8,214} Tanto a perda de função (*LoF*) como as mutações *missense* estão associadas a um risco aumentado para o espectro da ELA/FTD, e mutações que causam uma redução de 50% dos níveis de proteína *TBK1* são consideradas patogénicas.²²⁸⁻²³⁰

Vesícula Associada à Proteína B de Membrana- VAPB

As mutações do gene VAPB (principalmente a mutação P56S) estão relacionadas com as doenças do neurónio motor, descrito pela primeira vez em algumas famílias brasileiras nos anos 60.²³¹ Inicialmente classificada como atrofia muscular espinhal proximal (atrofia muscular espinhal do tipo tardio autossómico dominante no adulto, tipo *Finkel*), outros sintomas, como a miotonia e disautonomia, foram reportados.²³² As doenças do neurónio motor relacionadas com a VAPB são caracterizadas por um curso de evolução mais lento que a forma clássica de ELA.¹³⁹

1.3.3. Factores de Risco Ambientais

Existe um grande volume de literatura sobre o papel dos factores de risco ambientais na ELA. No entanto, com excepção do tabagismo, nenhum factor de risco ganhou ampla aceitação como um preditor seguro para a ELA.⁹⁶

Tabagismo

A evidência do tabagismo como risco para a ELA foi avaliada em três revisões sistemáticas/meta-análises.^{96,121} Em 2009, Armon, autor de uma das revisões sistemáticas, classificou o tabagismo como um factor de risco de nível A ("factor de risco estabelecido").⁹⁶ Intrigantemente, o tabagismo pode ser um factor de risco para as mulheres, apenas na pós-menopausa,^{233,234} mas talvez não nos homens.²³⁵ Alguma controvérsia sobre o papel do tabagismo na ELA parece permanecer sem solução, devido à existência de estudos com resultados divergentes. Mais recentemente, o tabagismo activo pós-diagnóstico foi identificado como factor negativo de prognóstico no curso da doença.²³⁶

Índice de Massa Corporal (IMC)

Os pacientes com ELA, têm um IMC mais baixo e menor ingestão de calorias e proteínas, do que os indivíduos controlo.²³⁷ O IMC é um indicador negativo de prognóstico. Estudos longitudinais de *coorte* sugerem que indivíduos do sexo

masculino com baixo peso têm um risco significativamente maior de terem ELA, em comparação com homens de peso normal.²³⁸

Estado Nutricional

Uma alta ingestão de carboidratos foi associada a um aumento do risco de ELA, enquanto a gordura total, ácidos gordos saturados, ácidos gordos monoinsaturados e ácidos gordos polinsaturados tendem a reduzir o risco de ELA. Os ácidos gordos polinsaturados podem modular o metabolismo lipídico, o *stress* oxidativo e os processos inflamatórios.²³⁹⁻²⁴² Assim, uma dieta rica em gordura parece ter um efeito neuroprotector.^{243,244} Foi sugerido que o aumento da ingestão de frutas e vegetais pode proteger contra o *stress* oxidativo pelo fortalecimento do sistema de eliminação de radicais livres.²⁴⁵ A evidência é escassa relativamente ao papel de outros factores dietéticos, incluindo o consumo de café ^{246,247} e o álcool. ^{248,249}

Actividade Física

Este é um tema complexo, ainda sem resposta definitiva.²⁵⁰ Alguns estudos sugerem que um estilo de vida muito activo e uma actividade física vigorosa aumentam o risco de ELA.²⁵¹ O interesse do estudo do papel da actividade física na ELA cresceu na década de 2000, após ter sido reportado o aumento do risco da doença em jogadores italianos de futebol profissional.²⁵²

Segundo Longstreth e colaboradores, a actividade física vigorosa poderia potencializar o efeito de uma toxina nos neurónios motores através de vários mecanismos, especialmente se os efeitos da toxina fossem mediados pela excitação das células nervosas. ²⁵³

No entanto, uma revisão sistemática de 37 estudos concluiu pela falta de elementos que permitam sustentar que a actividade física seja um factor de risco para ELA.²⁵⁴ Tem sido sugerido que pode haver um factor comum subjacente, relativamente à aptidão física, quanto à susceptibilidade à ELA, o que pode explicar a heterogeneidade observada nos resultados.²⁵⁰

Trauma/Lesão Cranioencefálica

Foi reportado um risco moderadamente elevado de ELA entre os indivíduos com trauma cranioencefálico prévio,²⁵⁵ em particular em relação ao traumatismo grave há menos de 1 ano.²⁵⁶ Mas, lesões mais antigas (11–30 anos antes) podem estar associadas com ELA de início bulbar,²⁵⁶ o que parece suceder nos futebolistas.²⁴⁷

Num grande estudo de base populacional,²⁵⁷ foi sugerido que eventos traumáticos repetidos ocorrendo pelo menos 5 anos antes do diagnóstico estão associados a um risco incrementado de ELA. A neuroinflamação relacionada com o trauma, com a consequente activação microglial, ruptura da barreira hematoencefálica, disfunção mitocondrial e excesso de radicais oxidativos e nítricos e a acumulação da proteína *tau* têm sido indicados como mecanismos indutores da ELA, após traumatismos cranianos.²⁵⁸

Metais

A exposição a metais pesados é outro factor de risco que tem sido frequentemente sugerida e estudada numerosas vezes. Muitos estudos investigaram associações entre alumínio, cádmio, cromo, manganês e outros metais, com a ELA.²⁵⁹

Tem havido um interesse particular no chumbo, mercúrio e selénio, em parte devido à reconhecida toxicidade neuromotora desses metais, e também pela descrição de casos que mimetizam a ELA após exposições agudas.²⁶⁰ As propriedades neurotóxicas do manganês são bem conhecidas.²⁶¹ O manganês atravessa a barreira hemato-encefálica e acumula-se no SNC.^{261,262} Soldadores expostos ao manganês sofreram de defeito da motricidade fina.²⁶³ Um estudo descreveu concentrações de manganês maiores no LCR do que no plasma na ELA, sugerindo um transporte de manganês para o SNC.²³⁹ O chumbo tem sido historicamente apontado como tendo um papel na etiologia da ELA.²⁶⁴⁻²⁷³ O ferro serve como co-factor para enzimas reguladoras da cadeia transportadora de electrões, na mitocôndria. O conteúdo de ferro cerebral aumenta com a idade e a acumulação de ferro tem sido observada em outros distúrbios neurodegenerativos.²⁷⁴ E nos pacientes com ELA, o aumento da concentração de ferro tem sido reportado na medula espinhal e no córtex motor.²⁶⁵ O potencial papel do selénio tem sido investigado em aglomerados endémicos de ELA, em regiões ricas em selénio da Dakota do Sul²⁷⁵ e na Itália.²⁷⁶ Estudos recentes sobre a concentração de selénio no LCR em pacientes de ELA, na Itália, mostraram concentrações elevadas de selenito, possivelmente relacionadas com exposição ao selénio na água potável.²⁷⁷ Até que ponto esses resultados podem ser generalizados para outras populações ainda precisa de ser elucidado.

Outros metais com potencial relevância para a ELA são: cobre, alumínio, arsénio, cádmio, cobalto, zinco, vanádio e urânio, sendo que quase todos foram descritos como tendo concentrações significativamente elevadas no LCR.²⁷⁸

Factores de Risco Ocupacionais e Ambientais

Trabalhadores com várias profissões, com exposições aparentemente díspares, foram reportados, como tendo risco aumentado de ELA. As profissões incluem, atletas profissionais, carpinteiros, trabalhadores da construção, electricistas, trabalhadores rurais, cabeleireiros, pintores de casas, técnicos de laboratório, operários de couro, montadores de máquinas, trabalhadores de serviços médicos, militares, enfermeiras, trabalhadores de fábricas de produção de energia, metalúrgicos de precisão, programadores, trabalhadores da borracha, pastores, trabalhadores de tabaco, veterinários e soldadores.^{279,280} Essas profissões envolvem potencialmente exposições de trabalho a produtos químicos, pesticidas, metais e campos electromagnéticos (EMF).^{278,281} No entanto, os denominadores comuns entre essas diferentes ocupações não são facilmente identificáveis.

Os militares estão expostos a uma bateria de factores potencialmente prejudiciais, incluindo esforço físico e psicológico, trauma, agentes transmissíveis (por exemplo, vírus), vacinas, substâncias tóxicas (por exemplo, metais pesados e químicos) e outros tóxicos ambientais. Embora a literatura actual sugira uma associação positiva entre o serviço militar e a ELA, não existe consenso quanto a uma relação definitiva.²⁸² Um artigo de revisão recente concluiu que, embora haja evidências que sugerem um papel do serviço militar no risco de ELA, é muito prematuro concluir sobre uma relação causal.^{103,283}

Choque Eléctrico e Campo Electromagnético

A possibilidade de um intenso choque eléctrico causar ELA é atraente, devido aos efeitos óbvios da electricidade no sistema neuromuscular. No entanto, uma revisão de 31 artigos aponta para uma fraca evidência de uma relação causal.⁹⁴ Nestes estudos, o choque eléctrico intenso foi associado a um risco aumentado de síndrome motora medular não-progressiva, mas não à ELA.^{94,284}

A associação reportada da ELA com campos magnéticos é ainda menos suportada que a eventual relação com campos eléctricos.^{280,281,285,286}

Pesticidas e Produtos Químicos

Os pesticidas, amplamente utilizados em todo o mundo, podem ser identificados em várias concentrações no ar, nos alimentos e na água. Uma associação entre a utilização de pesticidas e a ELA foi explicitamente avaliada e sugerida em estudos anteriores.^{266,267,287,288} Houve um interesse considerável no papel dos pesticidas como factores de risco para a ELA e uma série de revisões sistemáticas e meta-análises foram realizadas. Numa revisão de 2007, onde foram avaliados os resultados de 38 estudos,^{94,259} com a inclusão de solventes orgânicos, produtos químicos agrícolas e pesticidas, não suportou esta associação. A questão foi abordada novamente em duas meta-análises sobre os pesticidas e publicadas em 2012. O estudo de Kamel *et al*, incluindo novos dados de *coorte* e uma meta-análise de 8 estudos anteriores,²⁸⁹ concluiu que a exposição aos pesticidas como um grupo estava associada a risco de ELA, mas não encontrou associações significativas para as categorias de pesticidas.²⁸⁹ Malek *et al*. realizou a meta-análise de 6 estudos e constatou que a exposição a pesticidas foi um risco significativo para os homens, mas não para as mulheres.²⁹⁰ Uma revisão sistemática de 2014 de Kang e colaboradores, teve um objectivo diferente: avaliar o risco de ELA relativamente à residência rural, agricultores e exposições a pesticidas.²⁹¹ Este estudo suporta uma associação entre a exposição a pesticidas e a ELA, as estimativas de risco para análise de subgrupo entre exposição a pesticidas e ELA indicaram uma associação positiva significativa para os homens (OR 1,96).²⁹¹ Por outro lado, numa meta-análise efectuada por *Belbasis et al*, em 2016, os resultados foram inconclusivos para pesticidas como um factor de risco para ELA.²⁹²

Outras Condições Médicas

A crença geral de que a ELA é uma doença multifactorial complexa sugeriu a importância de estudar a relação entre a ELA e outras condições médicas, que podem partilhar factores de risco ambientais ou uma predisposição genética à ELA. Para além do possível papel do traumatismo cranioencefálico,²⁹³⁻²⁹⁵ foram apontadas como factores associados à ELA doenças metabólicas,²⁹⁶⁻²⁹⁹ cancro³⁰⁰⁻³⁰⁴ e neuroinflamação.³⁰⁵⁻³⁰⁷

Cianotoxinas

Tem sido colocada a hipótese que a exposição ambiental crónica ao aminoácido neurotóxico não-proteico β -N-metilamino-l-alanina (BMAA) pode ser um factor de risco ambiental para ELA.³⁰⁸

Essa hipótese foi inicialmente baseada em relatos de elevada prevalência de ELA, doença de Parkinson e demência (o complexo ELA-PDC) no Guam e associação ao consumo de BMAA presente nas sementes da *Cycad Cycas micronesica*.^{309,310} O BMAA pode ser produzido por cianobactérias, encontradas em quase todos os *habitats* terrestres e aquáticos.³¹¹ Apesar de grande esforço, estão ausentes, no entanto, evidências definitivas que suportem esta hipótese.⁹⁴

1.4. MECANISMOS PATOGENICOS NA ELA

Têm sido efectuados progressos na identificação das causas genéticas da ELA,^{5,312} e modelos animais, em ratos, ratinhos, peixes-zebra, moscas, vermes e leveduras, foram desenvolvidos para estudar como as mutações causam degeneração do neurónio motor, de forma a modular os processos biológicos envolvidos. Todos esses modelos têm limitações e nenhum recapitula totalmente a doença humana, em parte porque a maioria dos modelos são suportados na super-expressão de genes e porque o neuroeixo humano difere substancialmente do neuroeixo de animais inferiores. No entanto, os resultados de modelos animais podem contribuir para a nossa compreensão da biologia celular subjacente e pode abrir novos caminhos para o desenvolvimento de medicamentos inovadores.

Na realidade, a lesão celular na ELA é provavelmente o resultado de muitos mecanismos diferentes. A importância relativa com que cada um desses factores contribui para a biopatologia da doença humana não pode ser totalmente apurado, e seria errado assumir que todos esses factores estão envolvidos em todos os casos de ELA, pois a doença é heterogénea. Não obstante, cada um dos mecanismos deve ser considerado em detalhe, pois representam o nosso conhecimento actual da fisiopatologia da ELA e podem permitir futuros novos tratamentos.

Muitos processos celulares e moleculares têm sido implicados; incluindo a disfunção mitocondrial, o distúrbio do transporte axonal, a agregação de proteínas tóxicas, a ineficiência da degradação protéica (envolvendo o proteassoma ou a

autofagia, ou ambos), disseminação priónica, excitotoxicidade, diminuição do suporte neurotrófico por parte de células não-neuronais, *stress* oxidativo, hipermetabolismo, inflamação, defeitos do metabolismo do RNA e toxicidade do RNA. As evidências para tais mecanismos foram descritas extensivamente em muitos artigos.^{3,313,314}

Para além destas vias moleculares disfuncionais dos neurónios motores, as células vizinhas não-neuronais, incluindo astrócitos, microglia e oligodendrócitos, desempenham um papel importante no processo da doença, influenciando negativamente a progressão da ELA.^{11,171,313-318}

Defeitos em algumas dessas vias podem ser fenómenos secundários e a genética seria a abordagem inicial lógica para identificar o processo fisiopatológico primário subjacente.⁶²

A separação entre esses diferentes mecanismos patogénicos é artificial e é mais provável que uma combinação de diferentes mecanismos de interacção aconteça (Figura 11),¹¹ contribuindo para uma via final de retracção axonal e perda do neurónio motor.

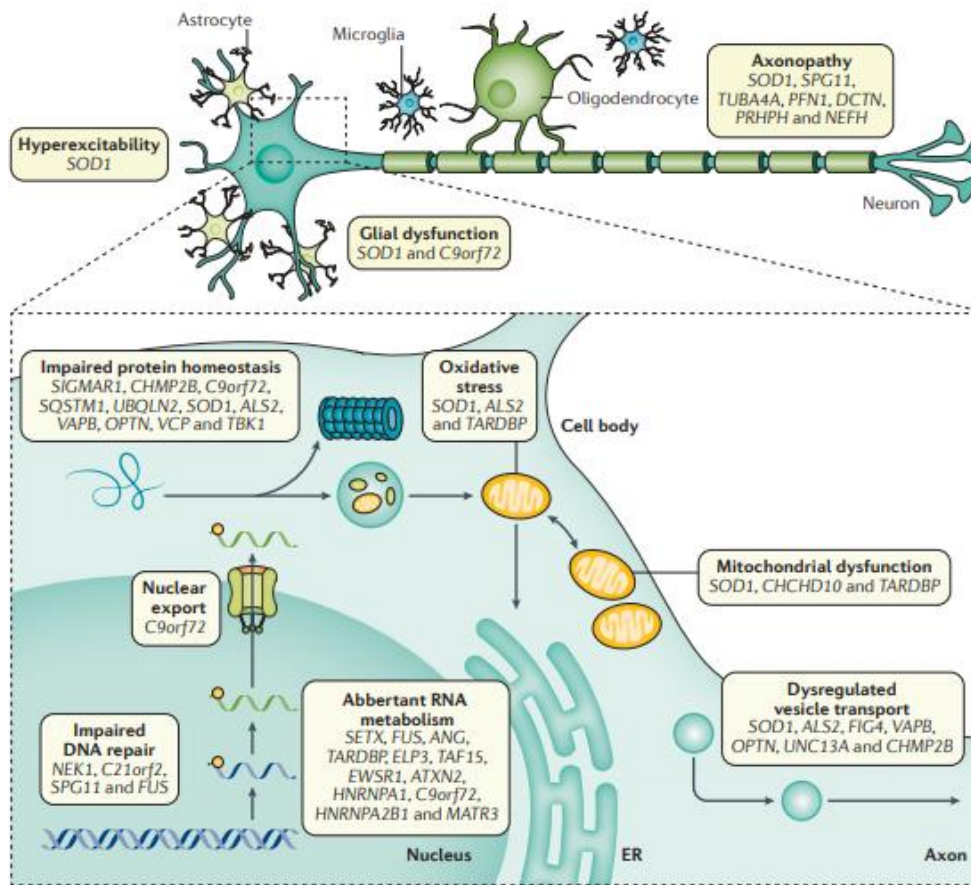


Figura 11| Fisiopatologia da ELA.

Mutações em vários genes que foram implicados na fisiopatologia da esclerose lateral amiotrófica (ELA) podem causar lesão celular através de mais de um mecanismo, embora estejam frequentemente interligados. O SOD1 é o gene estudado mais intensamente como implicado na ELA, enquanto os efeitos de algumas mutações, como os da ALS3 e ALS7, ainda são desconhecidos. O metabolismo anormal do RNA e a homeostase proteica deficiente são factores predominantes que ligam genes causadores de ELA com a lesão neuronal. A disfunção mitocondrial pode surgir de uma mutação na CHCHD10, assim como de perturbação da cadeia respiratória secundária à formação de agregados proteicos originados por outras mutações. Outros mecanismos podem alterar directamente a função neuronal (como a exportação nuclear, a reparação do DNA e o transporte de vesículas) e das células de glia. Além disso, a hiperexcitabilidade neuronal e axonal têm sido implicadas na ELA. A interacção destes mecanismos é indicada por setas. Legenda da figura: ER| retículo endoplasmático. Adaptado de Hardiman *et al.* (2017).¹¹

Excitotoxicidade Induzida pelo Glutamato

Excitotoxicidade é a toxicidade induzida pela estimulação excessiva pelo glutamato, que leva à entrada abundante de cálcio (Ca^{2+}) nos neurónios.¹¹ Na ELA, a expressão do transportador de aminoácidos excitatórios 2 (EAAT2),^{76,319} responsável pela recaptação sináptica do glutamato, está reduzida nos astrócitos.³¹⁹ O glutamato, principal neurotransmissor excitatório do SNC, é

sintetizado no terminal pré-sináptico e difunde-se pela fenda sináptica, activando receptores pós-sinápticos ionotrópicos (receptores NMDA (N-Metil-D-Aspartato) e AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico) e metabotrópicos (MGluRs), a contribuição relativa destes para a patogénese da ELA permanece incerta.³²⁰ Consequentemente, isso resulta em quantidades excessivas de glutamato na fenda sináptica que induz o fluxo de Ca^{2+} , com activação de vias enzimáticas dependentes deste ião.³²⁰ Os neurónios motores são muito sensíveis a esse influxo maciço de Ca^{2+} , uma vez que têm baixa capacidade tamponante de Ca^{2+} e expressam mais receptores de AMPA, que possuem menos subunidades GluR2 do que em outros tipos de neurónios.³¹¹ No entanto, também se observa um toxicidade glial pela acção do glutamato.³²⁰ Esta hipótese excitotóxica originou um conjunto de trabalhos destinados a desenvolver medicamentos neuroprotectores.³²¹

Stress Oxidativo

O interesse inicial no papel do *stress* oxidativo na ELA foi estimulado pela descoberta de que as mutações no gene superóxido dismutase (SOD1) estão associadas a casos de ELA familiar.³²² Quando as mutações SOD1 foram descritas pela primeira vez, uma perda de função da superóxido dismutase (SOD) foi fortemente suspeita, sugerindo um papel proeminente do *stress* oxidativo na fisiopatologia da doença. Actualmente, sabe-se que o principal elemento não é a perda da função da enzima SOD, mas sim um aumento da toxicidade.

Vários factores ambientais podem contribuir para a geração de radicais livres nocivos, tanto espécies reactivas de oxigénio (ROS) quanto espécies reactivas de nitrogénio (RNS). O aumento da produção de ROS, originadas pelo metabolismo do oxigénio, pode causar lesão de lípidos, proteínas e do DNA, com morte celular.³²³ Como consequência, tem sido sugerido que as proteínas que neutralizam ou reduzem os níveis de ROS poderiam ser usadas no tratamento da ELA.^{69,324} É claro que o *stress* oxidativo interage e potencialmente exacerba outros processos fisiopatológicos que contribuem para a lesão do neurónio motor, incluindo excitotoxicidade, dano mitocondrial, agregação de proteínas, *stress* do retículo endoplasmático e alterações na sinalização de astrócitos e microglia. Vários marcadores resultantes de lesão celular pelos radicais livres foram identificados no LCR, urina e no sangue de doentes com ELA.^{325,326} O gene da resistência à

oxidação 1 (OXR1) mostrou-se crítico para a resistência ao *stress* oxidativo no modelo animal, a deleção desse gene causa morte neuronal em ratinhos e a sua sobre-expressão é protectora em animais de ELA.³²⁷ Tem sido demonstrado recentemente que a integridade do domínio TLDC (o único domínio C-terminal das proteínas OXR) é essencial para conferir neuroprotecção.^{69,324}

Disfunção Mitocondrial

As mitocôndrias desempenham um papel fundamental na produção de energia e no tamponamento de Ca^{2+} . Na ELA, foram reportadas disfunção e alterações morfológicas das mitocôndrias.¹¹ Agregados proteicos no espaço inter-membranar mitocondrial interrompe a importação de proteínas e causa dano oxidativo nas proteínas mitocondriais, perturbando o funcionamento da cadeia respiratória. Consequentemente, originam-se ROS que podem desencadear mecanismos de morte celular apoptótica e compromisso do funcionamento neuronal.³²⁸ Além disso, a deficiência das mitocôndrias pode induzir degeneração axonal, com envolvimento da placa neuromuscular.^{329,330} O modelo animal suporta a função das mitocôndrias na integridade da função celular dos neurónios.^{330,331} Na verdade, a SOD1 mutante pode ser observada no espaço inter-membranar no modelo animal, com redução da importação de proteínas e disfunção da cadeia respiratória.^{332,333} Muitas das funções celulares são reguladas pela sinalização entre o retículo endoplasmático e a mitocôndria, pela associação entre a proteínas do ER VAPB (*vesícula associada à membrana da proteína associada a proteína B -VAPB*) e o regulador externo da proteína de membrana mitocondrial externa, proteína tirosina fosfatase 51 (PTPIP51).³³⁴ Essas associação são perturbadas pelas mutações TARDBP e FUS.^{335,336} As mutações da CHCHD10, que estão também estão associadas à ELA familiar, podem promover a perda das junções das cristas mitocondriais, com *noxa* do genoma mitocondrial, causando apoptose.^{11,337} Em modelos de ELA associada a *C9orf72*, o dipéptido proteico *poly* (GR) da expansão repetida G4C2 parece comprometer a função mitocondrial, causar *stress* oxidativo e danos no DNA.^{11,338}

Danos e Reparação do DNA

Foi sugerida que a reparação do DNA está comprometida e tem um papel relevante na fisiopatologia da ELA.¹¹ As mutações no gene FUS estão associadas a redução na eficiência da reparação do DNA. Tal facto, pode resultar numa deslocalização

adicional do FUS citoplasmático e, conseqüentemente, na agregação e neurodegeneração.³³⁹ Foi igualmente reportado que os *loops* R, que são originados pela expansão repetida em *C9orf72*, são capazes de desencadear danos no DNA e instabilidade do genoma.¹¹ Na tentativa de reparar o dano, as células activam a resposta ao dano do DNA, mas quando esse dano não pode ser reparado, é induzida a apoptose.³⁴⁰ Mutações nos genes *NEK1* e *C21orf2*, associados à ELA, codificam proteínas envolvidas na reparação do DNA,^{154,167} embora as vias biológicas associadas à sua acção sejam pouco conhecidas.¹¹

Metabolismo/Homeostase do RNA Aberrante

A identificação de mutações causadoras de ELA nas proteínas de ligação ao RNA, TDP-43 e FUS,^{137,141,185,198,341-343} levantou a hipótese de que perturbações na homeostase do RNA possam estar envolvidas na patogénese da ELA.³¹⁴ O TDP-43 e o FUS, são proteínas que regulam o metabolismo do RNA em todas as fases do ciclo de vida do RNA e podem ligar-se a milhares de diferentes RNAs. Tal facto, significa que a deslocalização incorrecta dessas proteínas do compartimento nuclear para o citoplasmático resultará no compromisso da sua função.⁶²

Foi igualmente descrita, que a expansão repetida do hexanucleótido G4C2 na região não codificante do gene *C9orf72*, pode perturbar a homeostase do RNA e resultar em toxicidade,¹¹ dado que :

- a) forma estruturas G-quadruplex que interagem com factores de processamento de RNA;
- b) induz a produção de espécies de RNA anormais que são retidas no núcleo, definidas como focos nucleares de RNA, que induzem o sequestro de proteínas de ligação ao RNA;
- c) levam à formação de estruturas híbridas de RNA-DNA, chamadas de *loops*-R, que aumentam a susceptibilidade a danos no DNA e levam à instabilidade do genoma.

As mutações associadas à ELA, como as mutações em ANG (codifica a angiogenina, que tem um papel no processamento de RNA) e SETX (codifica a senataxina, que regula a transcrição de ribossomas RNA)^{11,344-346} também podem levar a distúrbios no metabolismo do RNA. Adicionalmente, outras mutações, como

mutações em ELP3 (proteína 3 complexa do codificador de alongamento),¹⁶¹ TAF15 (codifica o factor 2N associado a proteína de ligação TATA)³⁴⁷ e EWSR1 (codificando a proteína de ligação EWS ao RNA)¹¹ também foram associados com a ELA. Esses genes codificam proteínas que estão envolvidas na regulação do metabolismo do RNA; o ELP3 contribui para a regulação do alongamento da transcrição, e o TAF15 e o EWS, que são funcionalmente e estruturalmente relacionados ao FUS, têm um papel no controlo da transcrição e *splicing* alternativo.¹¹

Stress do Retículo Endoplasmático

O retículo endoplasmático (ER) é um compartimento celular responsável pela síntese proteica, processamento pós-tradução, estruturação de proteínas, e libertação de proteínas biologicamente activas no seu local alvo adequado.^{314,348} Esses processos são dependentes do Ca²⁺. Além disso, o ER também está envolvido na homeostase do Ca²⁺ intracelular e no equilíbrio redox. Um desequilíbrio na homeostase de Ca²⁺ no ER e a acumulação de SOD1 mutante, ou o dano induzido por ROS, podem perturbar o estado fisiológico do ER e resultar em *stress* no ER.^{348,349} Para retornar a um estado fisiológico normal, é activada a resposta a proteínas destruturadas (UPR, do inglês: *Unfolded Protein Response*). No entanto, na ELA esta UPR não consegue restaurar o estado normal e, conseqüentemente, as cascatas de sinalização da morte celular são activadas com a indução de apoptose.^{314,348}

Perturbação na Dinâmica do Citoesqueleto e Transporte Axonal

Os neurónios motores são as células mais assimétricas na natureza, pois possuem axónios muito longos (com alguns axónios com mais de um metro de comprimento), tendo um requisito crucial para que o transporte axonal forneça os componentes sintetizados nos corpos celulares aos axónios e às sinapses, incluindo RNAm, proteínas, lípidos, organelos e vesículas.³⁵⁰

Na ELA, a desorganização do citoesqueleto axonal e o transporte axonal mais lento, tanto anterógrado quanto retrógrado, são uma característica comum e foram reportados antes do início dos sintomas.^{16,163,351} De facto, a redução no transporte retrógrado pela mutação na dineína citoplasmática retrógrada motora,^{314,352} provoca doença do neurónio motor nos humanos. Até o

momento, a causa subjacente dos defeitos de transporte axonal na ELA ainda não é totalmente compreendida, uma vez que as mutações na maquinaria de transporte axonal, como mutações na proteína dinactina, foram reportadas apenas num número reduzido de casos.³⁵⁰

Homeostase Proteica Deficiente, Degradação e Controlo de Qualidade

Mutações em alguns genes levam à tradução deficiente de proteínas, com localização celular anormal, que podem prejudicar directa ou indirectamente a maquinaria proteica ou autofágica da célula, levando a um compromisso do *turnover* das proteínas. De facto, os genes associados a ELA familiar codificam proteínas que podem promover a disfunção do sistema ubiquitina-proteassoma.¹¹ A presença de agregados de proteínas contendo produtos de genes ELA, como os dipéptidos *SOD1*, *TDP-43*, *FUS*, *UBQLN2* ou *C9orf72*, nos neurónios motores afectados é geralmente conhecida como uma marca típica da ELA.^{69,316,353} É provável que esses agregados perturbem a homeostase proteica e induzam o *stress* celular, interferindo em várias funções celulares, como a libertação de proteínas, transporte axonal, arquitectura do citoesqueleto e funcionamento mitocondrial.³¹³ Agregados de proteínas podem, também, sequestrar RNA e outras proteínas essenciais para a função celular normal.³¹⁷ Em última análise, isto conduz à retracção axonal, desinervação e morte celular.³⁵⁴

Neuroinflamação

A neuroinflamação, caracterizada pela activação microglial e astrocitária, infiltração de linfócitos T e superprodução de citocinas inflamatórias, foi demonstrada em associação com a perda neuronal em tecidos animais e humanos, mesmo durante a fase pré-sintomática da ELA.³⁵⁵ O envolvimento das células imunitárias, exercem efeitos deletérios ou protectores sobre os neurónios motores, dependendo do estadió da progressão da doença; no entanto, o mecanismo está longe de ser completamente elucidado.

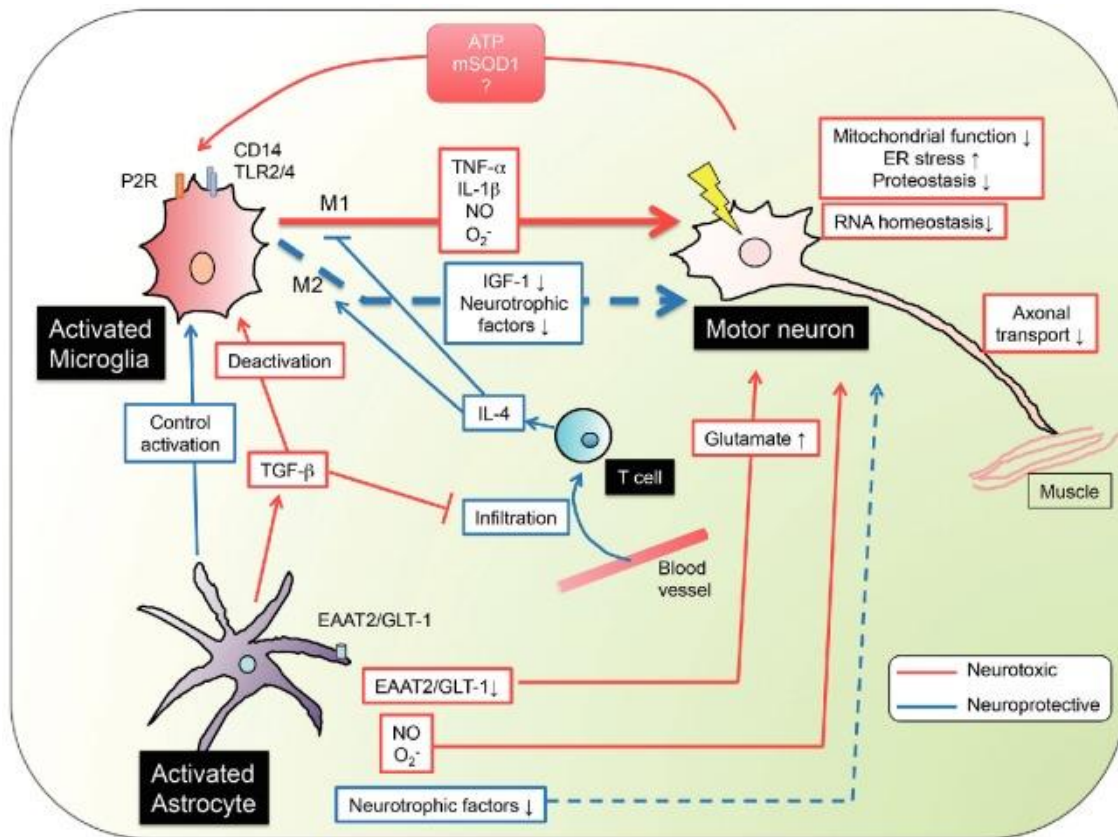


Figura 12| Neurodegeneração autónoma celular e não-celular na ELA.

Com a acumulação de lesões dependentes do metabolismo no interior dos neurónios motores inicia-se a doença do neurónio motor. Factores não identificados, derivados dos neurónios motores danificados, causam activação microglial. Os astrócitos e os linfócitos T infiltrados também regulam o estado de activação da microglia. A microglia e astrócitos anormalmente activados produzem elevados níveis de moléculas pró-inflamatórias, juntamente com perdas de propriedades neuroprotectoras dessas células gliais, causando mais danos aos neurónios motores, portanto, levando à rápida progressão da doença. Entre os vários factores secretados pelos astrócitos doentes, identificaram-se o TGF-β1 como um dos factores de exacerbação que leva à progressão da doença através da interferência da reacção neuroprotectora mediada pela microglia e pelos linfócitos T. Adaptado de Komine *et al.* (2015).³⁵⁵

A neuroinflamação pode ser observada em estudos de imagem em pacientes com ELA, em amostras *post-mortem* humanas e em modelos animais.³⁵⁶ A microglia compõe a primeira linha de defesa imunológica no sistema nervoso central. As células microgliais monitorizam o meio e respondem a “sinais de perigo”. Têm sido reportado que os neurónios motores e astrócitos lesados libertam proteínas (tais como mSOD1) que activam a microglia através de vias dependentes de CD14, TLR 2 e TLR4. Uma vez activada, a microglia apresenta fenótipos distintos, com função neurotóxica ou neuroprotectora, dependendo do

estado de activação e do estadió da doença. Durante o estadió inicial lento progressivo da ELA, a microglia apresenta um fenótipo M2 (pode ser neuroprotector) com expressão regulada positivamente de marcadores M2, como CD206 e Ym1, promove a reparação e a regeneração tecidual e interage com sinais protectores, como CD200 e fractalquina.³⁵⁷⁻³⁵⁹ Conforme a doença progride, os neurónios envolvidos libertam “sinais de perigo” (por exemplo, mSOD1) que induzem a microglia a adquirir um fenótipo M1 (tóxico - o fenótipo classicamente activado) com uma secreção aumentada de NOX2, ROS e citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- α , IL-1 e IL-1 β).³⁵⁹⁻³⁶¹ Estudos de co-cultura *in vitro* demonstram ainda que a microglia na fase M2 aumenta a sobrevivência dos neurónios motores, enquanto a microglia M1 tem acção tóxica para as mesmas células.^{359,360} Por outro lado, os astrócitos adquirem propriedades tóxicas e contribuem para a morte dos neurónios,³⁷⁶ enquanto os linfócitos T infiltrados controlam a resposta microglial limitando seus efeitos lesivos.³⁷⁷

Os astrócitos desempenham um papel importante na ELA, está por esclarecer como as proteínas mutadas que estão associadas à ELA, contribuem para a disfunção dos astrócitos e como estes exercem toxicidade autónoma nos neurónios. Em condições normais, os astrócitos eliminam o excesso de glutamato das fendas sinápticas através dos transportadores de glutamato.³⁵⁹ Nos doentes com ELA, bem como no rato transgénico mSOD1, a perda do transportador de glutamato, EAAT2/GLT-1, levou a uma captação menos eficiente de glutamato e, portanto, exacerbando a degeneração celular.³⁶²⁻³⁶⁵ Os astrócitos mSOD1, mas não os astrócitos *wild-type*, foram reportados como tóxicos para os neurónios motores,³⁶⁶ tal facto, pode ser prevenido por antioxidantes e inibidores da síntese do óxido nítrico.^{366,367} Ferraiuolo *et al.* revelaram uma disfunção metabólica nos astrócitos da ELA, particularmente no transportador de efluxo de lactato, com consequente diminuição dos níveis de lactato na medula espinhal.³⁶⁸ Além disso, astrócitos de tecidos *postmortem* de pacientes de ELA e ratos SOD1^{G93A} foram reportados exercer efeitos tóxicos sobre os neurónios motores, secretando mediadores inflamatórios, como prostaglandina E2, leucotrieno B4, óxido nítrico e NOX2.^{367,369,370} A deleção da mutação SOD1 num modelo animal, aumentou a sobrevida e atrasou a progressão da doença.³⁷¹ A análise de amostras da medula espinhal e do LCR de pacientes de ELA revelou aumento da activação da microglia

e de linfócitos,^{359,372,373} confirmando que a neuroinflamação pode desempenhar um papel na degeneração do neurónio motor.



BIOMARCADORES MOLECULARES NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA

“Rapid advances in the understanding of the molecular biology of ALS are making the prospect of disease-modifying therapy increasingly likely, so that the need for objective markers of disease activity has never been greater.”

Turner, M. R (2018)

2.1. BIOMARCADORES NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA

REVISÃO DA LITERATURA

O diagnóstico da ELA normalmente requer um período significativo, que varia em média entre 12-18 meses.⁷⁶ Vários biomarcadores clínicos e moleculares têm sido propostos para acelerar o processo diagnóstico, ou mesmo para melhor definir o prognóstico. No entanto, os biomarcadores requerem validação e padronização, entre os diferentes centros clínicos.^{374,375}

O termo “biomarcador” foi definido como uma “característica que é objectivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patológicos ou de respostas biológicas a uma intervenção terapêutica”.^{325,376} A “*Food and Drug Administration*” (FDA) nos EUA, reconhece quatro categorias de biomarcadores: de diagnóstico, de prognóstico, preditivos e farmacodinâmicos.^{376,377}

Um biomarcador diagnóstico é uma característica da doença relacionada com a presença de um estado fisiopatológico. Os biomarcadores de diagnóstico podem permitir o diagnóstico precoce da ELA, incluindo portadores pré-sintomáticos de mutações patogénicas, quando potenciais terapias seriam provavelmente mais eficazes.³⁷⁷ Além disso, estes biomarcadores devem diferenciar a ELA não apenas de indivíduos saudáveis, como de pessoas com doenças que possam mimetizar a ELA, incluindo outras doenças neurodegenerativas.

Os biomarcadores de prognóstico são características que informam sobre a progressão da doença. A estratificação de pacientes com ELA em grupos homogéneos quanto ao prognóstico teria implicações directas em estudos clínicos, melhorando o poder estatístico, reduzindo a sua duração e custos e revelar um efeito terapêutico em subgrupos específicos de pacientes.

Um biomarcador preditivo é uma característica que categoriza os pacientes de acordo com a probabilidade de resposta à terapia.

Finalmente, os biomarcadores farmacodinâmicos são medidas que se alteram em resposta a uma intervenção terapêutica.³⁷⁷

As características do (s) biomarcador (es) ideal (is) na ELA, estão descritas de forma resumidas na tabela 3:

Tabela 3| As características ideais para biomarcadores na esclerose lateral amiotrófica (ELA).

- | |
|--|
| ✓ Sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de esclerose lateral amiotrófica, idealmente antes do aparecimento de fraqueza muscular substancial, ou mesmo no estágio pré-sintomático para formas familiares; |
| ✓ Capacidade de discriminar os vários fenótipos clínicos (por exemplo, a atrofia muscular progressiva e a esclerose lateral primária); |
| ✓ Capacidade de prever o padrão de disseminação (por exemplo, progressão para insuficiência respiratória ou comprometimento cognitivo), de forma a antecipar intervenções (por exemplo, a ventilação não-invasiva); |
| ✓ Capacidade de monitorizar, de forma bem tolerada e simples, a progressão da doença, com sensibilidade suficiente para permitir um julgamento confiável. ^{325,378} |

Até hoje, vários esforços foram feitos para identificar biomarcadores relevantes nesta doença, estudando vários biofluidos, como o LCR, plasma, soro, saliva e urina. No entanto, a maioria dos estudos têm sido realizados no LCR, soro e plasma.^{378,379} Para validar um biomarcador, é preciso reconhecer as limitações da técnica analítica pela qual está a ser medido, a análise deve usar um procedimento operacional padronizado (SOP) e deve haver reprodutibilidade teste-reteste, idealmente incluindo diferentes centros.³⁸⁰

2.1.1. Biomarcadores Clínicos, Respiratórios e Neurofisiológicos na ELA

Actualmente, o diagnóstico de ELA baseia-se na avaliação clínica e nos achados electrofisiológicos. A expressão fenotípica da ELA é heterogénea, incluindo formas topograficamente restritas, formas de envolvimento lento ou rápido, formas associadas à FTD e formas esporádicas e familiares. Do ponto de vista fisiopatológico, esse facto levanta a questão de saber se a ELA é uma entidade única como doença ou uma síndrome de entidades clínicas diferentes decorrentes de mecanismos biológicos distintos. Uma maneira de responder a essa questão é determinar se as diferentes formas da doença apresentam marcadores comuns ou distintos. Um exemplo é a demonstração de que inclusões de neurónios motores TARDBP-positivos, que são característicos de formas esporádicas de ELA, não são encontradas em formas genéticas ligadas ao gene da SOD1, sugerindo que

algumas formas familiares e esporádicas podem não compartilhar a mesma via patogénica.³²⁵

As escalas funcionais constituem importante instrumento de quantificação da progressão da doença. A Escala ALSFRS-R é uma ferramenta clínica simples, sensível e universalmente aplicada para avaliar o estado funcional dos pacientes com ELA. A respectiva taxa de progressão prevê o tempo de sobrevivência.^{83,381} Por estas razões, é amplamente utilizada como uma medida de *outcome* nos ensaios clínicos. Trata-se de um questionário que avalia certas capacidades (tais como a articulação verbal, sialorreia, deglutição, escrita, autonomia na alimentação e no vestir/higiene, marcha, subir escadas e sintomas respiratórios (dispneia, ortopneia, suporte ventilatório)).

Um valor funcional baixo ou um rápido declínio, são consistentes indicadores de prognóstico.

Recentemente foram descritos dois sistemas de estadiamento na ELA. O estadiamento do *King's College*³⁸² e o *MITOS* (Milano-Torino).^{11,382,383} O primeiro depende do número de regiões afectadas e o segundo deriva da escala funcional ALSFRS-R. A figura 13 resume as principais características de ambos.

Uma vez que a IR é a principal causa de morte nestes doentes a avaliação respiratória é importante, e deve ser efectuada a cada 3-6 meses, tal como recomendado.¹¹² As medidas quantitativas mais utilizadas são a FVC e a capacidade vital lenta (SVC-“*Slow Vital Capacity*”), tanto em ensaios clínicos quanto na prática clínica, sendo este valor essencial para determinar a progressão da doença e as medidas de tratamento a implementar.³⁷⁶ Relativamente a ambos, um valor inicial anormal ou a sua redução rápida têm forte indicação prognóstica negativa. As pressões máximas são medidas mais sensíveis e, geralmente, incorporadas na avaliação regular destes doentes. Estas estimativas têm limitações nos doentes com parésia facial, como naqueles com início bulbar, pelo que outros métodos são utilizados, como a pressão inspiratória máxima nasal durante um *sniff* (SNIP), a ecografia do diafragma, ou a resposta motora do diafragma à estimulação do nervo frénico (amplamente utilizada no nosso centro).³⁷⁶

King's clinical staging	Staging	MITOS functional staging
Presymptomatic	0	Functional involvement (disease onset)
Involvement of one clinical region (disease onset)	1	Loss of independence in one functional domain
Involvement of two clinical regions	2	Loss of independence in two functional domains
Involvement of three clinical regions	3	Loss of independence in three functional domains
Substantial respiratory or nutritional failure	4	Loss of independence in four functional domains
Death	5	Death

Nature Reviews | Disease Primers

Figura 13| Sistemas de Estadiamento da ELA.

Adaptado de Hardiman *et al* 2017.^{11,383}

Diversas técnicas neurofisiológicas têm sido estudadas na ELA como medidas de progressão, como a amplitude das respostas motoras, o índice neurofisiológico e os múltiplos métodos para estimar o número de unidades motoras nos músculos. A discussão das várias técnicas e resultados fogem ao âmbito desta tese. No entanto são biomarcadores úteis, se utilizados por neurofisiologistas experientes.

2.1.2. Biomarcadores de Tecido e Fluidos

Os biofluidos são as amostras biológicas mais importantes para o diagnóstico clínico. O líquido cefalorraquidiano (LCR) representa uma fonte importante de biomarcadores para doenças neurodegenerativas, uma vez que está em contacto com o tecido e células neuronais; portanto, contém proteínas e metabolitos que podem indicar a presença e a extensão da neurodegeneração. Por outro lado, o sangue é a fonte mais utilizada de biomarcadores para várias doenças, uma vez que é facilmente obtido com métodos minimamente invasivos.³⁸⁴ A urina não requer métodos invasivos para a colheita e pode ser considerada como um excelente biofluido para análise.¹²⁶

Um biomarcador ideal deve exibir alta especificidade e sensibilidade para diagnóstico e monitorizar a progressão da doença. Progressos significativos foram feitos utilizando o LCR, soro e plasma na pesquisa de biomarcadores de ELA,

sendo que o estudo de biomarcadores na urina e saliva têm sido menos intensamente investigados nesta doença. No entanto, embora a descoberta de biomarcadores de ELA tenha tido enormes avanços na última década, a validação de biomarcadores e sua transferência para a rotina clínica ainda não atingiu uma fase de maturidade.

2.1.2.1. Biomarcadores do Líquido Cefalorraquidiano (LCR)

O LCR é um biofluido útil para análise devido à proximidade directa com o cérebro e a medula espinhal. É um ultrafiltrado de plasma, embora existam mecanismos homeostáticos no LCR que, por exemplo, mantêm concentrações iónicas ou proteicas diferentes das concentrações plasmáticas.³⁸⁵ Assim, a análise do LCR é representativa da actividade celular no SNC.³⁸⁰

No entanto, a colheita da amostra do LCR envolve a punção lombar, sendo esta relativamente invasiva. Este procedimento pode envolver alguns efeitos colaterais. Para estudos longitudinais o LCR é difícil de obter repetidamente. Os biomarcadores, como o sangue e o soro, são fontes mais atraentes, uma vez que podem ser obtidos fácil e repetidamente. A colheita de amostras de LCR em controlos saudáveis tem implicações éticas; portanto, muitos estudos utilizam amostras de pacientes com outras doenças neurológicas e não-neurológicas como controlos.^{325,386,387}

Neurofilamentos de Cadeias Pesadas Fosforiladas (NFH) e Neurofilamentos de Cadeias Leves (NFL)

Os biomarcadores do LCR mais promissores, identificados até o momento, são proteínas de neurofilamentos, um componente do citoesqueleto dos neurónios que é libertado após dano neuronal e axonal e que pode ser quantificado no LCR.^{380,388,389}

Os neurofilamentos (NFS) são heteropolímeros constituídos por 4 subunidades, cada uma com diferentes estruturas e funções. Os NFS são filamentos intermediários de 10 nm e as quatro subunidades que o constituem são: o neurofilamento de cadeia pesada (NFH-neurofilamento "*high*" ou pesado), o neurofilamento médio (*NF-M*-neurofilamento médio), o neurofilamento de cadeia leve (NFL-neurofilamento "*light*" ou leve) e a α -internexina no SNC. Este último é substituído pela periferina no sistema nervoso periférico (SNP).^{377,390-393} Os NFS

são expressos nos neurónios, aos quais fornecem suporte estrutural e determinam o calibre dos axónios. São libertados quando há lesão celular.³⁹³ Mutações nos genes que codificam NFH e NFL podem causar a doença de *Charcot-Marie-Tooth*,^{390,394} por outro lado deleções ou inserções no domínio do braço lateral ou no domínio da cauda C-terminal do NFH foram associados à ELA.^{162,395}

Os níveis de NFH e NFL no LCR emergiram como biomarcadores de diagnóstico em várias doenças neurodegenerativas,³⁹⁶ sendo que os doentes afectados com ELA têm níveis significativamente mais elevados quando comparados com controlos ou com outras doenças que mimetizam a ELA.³⁹⁷⁻⁴⁰⁰ Mais recentemente foi reportado que o NFL se encontrava mais elevado no LCR em outras doenças neurodegenerativas, como na doença de Alzheimer, doença de Parkinson e na demência frontotemporal.^{391,401,402,403,404} Resultados similares foram reportados para o NFH fosforilado.^{405,439,440,441,442} Os NFS no LCR de doentes com ELA foram descritos como estando mais elevados em doentes com maior envolvimento do UMN e com progressão mais rápida da doença.^{389,397,400,406} Desta forma os NFS no LCR podem ser úteis como um biomarcador de prognóstico.^{391,397,400,406,407} No entanto os níveis não tendem a alterar no curso da doença, sugerindo que um *plateau* dos níveis dos NFS no LCR é atingido quando o valor de morte neuronal tenha chegado ao pico.^{380,408} Alguns estudos abordam a necessária padronização usando SOPs, cuidadosamente projectados para colheita e processamento de amostras e a avaliação dos níveis de NFS nas amostras, entre centros.³⁸⁰

Num estudo do nosso grupo de investigação, exploramos o potencial diagnóstico da combinação do neurofilamento fosforilado de cadeia pesada (NFH) e factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF) como biomarcador na ELA.^{17,22} Observamos que os níveis de NFH estavam aumentados no LCR e se correlacionavam com o ritmo de progressão e duração da doença, o que está de acordo com outros estudos.^{398,405,409} Relativamente à sensibilidade e especificidade diagnóstica, os nossos resultados foram ligeiramente inferiores aos reportados em outros trabalhos.³⁹⁸ Tal facto, pode ser devido às diferentes populações analisadas e ao número de sujeitos incluídos. Por outro lado, em concordância com outros estudos,⁴¹⁰ observamos um nível mais baixo de VEGF no LCR de doentes com ELA.¹⁷ Até onde sabemos, o NFH e VEGF não são interdependentes; no entanto, exploramos o valor diagnóstico da combinação de ambos os biomarcadores.^{17,410} A razão NFH/VEGF nos pacientes com ELA foi maior que no grupo controlo.¹⁷

Foram observadas correlações (negativas) significativas entre esta razão e a duração da doença, (negativa) e (positivas) com o declínio funcional ou o valor da escala funcional. No nosso trabalho, esta razão revelou um valor diagnóstico maior do que a avaliação isolada do NFH.

Com exceção de alguns estudos de neuroimagem não existem dados disponíveis sobre a associação dos neurofilamentos do LCR com outros biomarcadores de lesão neuroaxonal periférica (SNP) ou do sistema nervoso central (SNC).^{398,400,411}

Proteína SOD Cu/Zn

Embora as mutações de *novo* no gene SOD1 sejam responsáveis por apenas uma pequena fracção da SALS, o grande suporte para a investigação dos biomarcadores da proteína SOD1 resultam de estudos pré-clínicos e clínicos.³⁷⁷ Recorrendo a um isótopo estável administrado por via oral (¹³C6-leucina) em combinação com espectrometria de massa, investigadores determinaram a cinética *in vivo* da proteína SOD1 em ratos que expressam a mutação SOD1 humana, e em indivíduos humanos saudáveis, demonstrando que a SOD1 é uma proteína de semi-vida longa, semelhante no LCR e no SNC.⁴¹²

O desenvolvimento de terapias genéticas, incluem o tratamento com oligonucleótidos *antisense* (ASOs) visando alterar a expressão das mutações de gene SOD1. Winer *et al.*⁴¹³ mostraram que ratos portadores da mutação SOD1^{G93A} tratados por terapia ASOs tinham níveis de RNAm e da proteína SOD1 diminuídos, no cérebro e no LCR. Adicionalmente, observaram que os níveis de SOD1 no LCR permaneciam estáveis durante o decurso da doença em doentes com SALS e não-tratados. Em conjunto, estes dados mostram que o LCR-SOD1 é um biomarcador farmacodinâmico adequado, embora careça de valor diagnóstico e prognóstico. O LCR-SOD1 está actualmente a ser utilizado como indicador farmacodinâmico para o estudo de ASOs de SOD1 na ELA.^{377,413}

Expansão Hexanucleotídica (GGGGCC) no Gene C9orf72

As espécies de RNA transcritas bidirecionalmente a partir da expansão de repetição intrónica C9orf72 passam pela tradução não-mediada por ATG (tradução RAN), em cada uma das três possíveis grelhas de leitura (em inglês *open reading frame*), para produzir cinco proteínas de repetição dipeptídica (DPRs).⁴¹⁴ Estas DPRs são activamente trocadas entre células, capazes de induzir neurotoxicidade em

modelos de ELA, sendo detectadas como inclusões neuronais (nucleares e citoplasmáticas) no sistema nervoso central *post-mortem* em doentes.^{414,415} Com o desenvolvimento de estratégias terapêuticas específicas para *C9orf72*, incluindo ASOs tendo como alvo o *C9orf72*, a utilização das DPRs como biomarcadores tem elevado potencial.³⁷⁷

Proteína TAR de Ligação ao DNA de 43 kDa (TDP43)

A proteína de resposta transactiva-de-ligação ao DNA de 43 kDa (TDP-43) é uma proteína de ligação versátil ao RNA/DNA, envolvida no metabolismo do RNA.

Inclusões neuronais e gliais de TDP-43 têm sido implicadas na patogénese da SALS e da FTD,^{380,416} pois os depósitos de TDP-43 hiperfosforilados e ubiquitinados formam corpos de inclusão no SNC.^{184,380,417-419} Essas inclusões são também observadas na maioria dos pacientes com FALS negativos para mutações SOD1.^{380,418 380,418} Estudos subsequentes encontraram níveis elevados de TDP-43 no LCR de pacientes com ELA, quando comparados com controlos saudáveis, indivíduos com outras doenças neurodegenerativas ou com patologia neuroinflamatória.⁴²⁰⁻⁴²² Nenhuma diferença foi encontrada entre os níveis de TDP-43 no LCR de pacientes com ELA com ou sem as expansões hexanucleotídicas G4C2 no gene *C9orf72*.^{126,416} Com base nessas evidências, a proteína TDP-43 é um potencial biomarcador para a maioria dos pacientes com ELA. Níveis elevados de TDP-43 no plasma⁴²³ e no LCR⁴²² foram detectados mesmo na fase inicial da doença.⁴²² Além disso, os níveis desta proteína diminuem no LCR com a progressão da doença,⁴²⁰ possivelmente reflectindo o declínio da libertação de TDP-43 pelos neurónios motores sobreviventes.^{380,418}

No entanto, num estudo de Feneerg e colaboradores, foi sugerido que avaliação do TDP-43 sérico seria mais apropriada, pois as concentrações séricas são 200 vezes mais elevadas que os níveis no LCR.⁴²⁴

Há pouca evidência disponível para a sua utilização como marcador de progressão ou de prognóstico, sendo necessários estudos longitudinais.³⁸⁰

Cistatina C

A cistatina C, um inibidor endógeno da proteinase da cisteína, tem sido sugerido como potencial biomarcador por desempenhar um papel importante na reparação do SNC, após lesão e doença.^{425,426} A cistatina C é fortemente expressa nos

neurónios, astrócitos, células endoteliais e microgliais do encefálo.⁴²⁷⁻⁴²⁹ Alguns estudos reportaram um papel neuroprotector da cistatina na doença neurodegenerativa, por ter características neuroprotectoras e neurotóxicas semelhantes ao *factor nuclear kappa B (NF-kB)*.^{430,431} Por isso é uma das proteínas mais investigadas do LCR.

Vários estudos identificaram a cistatina C como um potencial biomarcador no LCR de pacientes com ELA.⁴³²⁻⁴³⁴ Além disso, uma diminuição nos níveis de cistatina C na medula espinhal e astrócitos foi igualmente correlacionada com a formação de inclusões de TDP-43.⁴³⁵ A cistatina C é um inibidor de catepsinas B, H, K, L e S, tendo sido identificada como um componente dos corpos bunina, que são pequenas inclusões eosinofílicas do LMN.^{431,436} Um método baseado em proteómica detectou uma redução da concentração de cistatina C no LCR nos pacientes com ELA,^{431,437,438,439} sendo que esta redução se correlaciona com a esperança de vida dos doentes com início medular.⁴³⁹ A redução dos níveis de cistatina C não é específica dos doentes com ELA, ocorrendo noutras doenças neurodegenerativas,⁴³⁹ como doença de Alzheimer,⁴⁴⁰ sugerindo que os níveis de proteína cistatina C são uma assinatura comum para vulnerabilidade neuronal e neurodegeneração.⁴⁴¹

Portanto, mais estudos são necessários para determinar como os níveis diminuídos de cistatina C se relacionam com a patogénese e progressão da doença ELA.

MicroRNA (*miRNA*)

Em 2012, foi publicado o primeiro artigo sobre *miRNAs* como biomarcadores para ELA em amostras humanas.⁴⁴² Desde então, um grande número de estudos foi realizado no LCR, soro, plasma e na biópsia muscular de doentes com ELA.⁴⁴³

Os *miRNAs* são curtas cadeias de RNA não-codificantes (cerca de 20-25 nucleotídeos de comprimento) que desempenham um papel importante como reguladores endógenos da expressão génica, actuando a nível pós-transcricional, através da clivagem ou silenciamento.⁴⁴⁴ Os *miRNAs* são sintetizados a partir de *miRNAs* primários, que são transcritos no núcleo e têm uma expressão específica num tecido.^{443,445}

Os *miRNAs* possuem várias características intrínsecas que os tornam promissores como biomarcadores. Ao contrário de outras classes de RNA, os *miRNAs* são

notavelmente estáveis e, portanto, podem ser medidos de forma robusta em muitos fluidos corporais biológicos, incluindo plasma, lágrimas, saliva e LCR.⁴⁴⁶ De facto, *miRNAs* parecem resistentes à ebulição, a ciclos repetidos de congelação-descongelação, alterações de pH e à fragmentação por enzimas ou químicos.⁴⁴³ Além disso, evidência recente indica que os *miRNAs* podem ser detectados em fluidos biológicos e ser usados para “capturar” alterações nas células de origem, incluindo neurónios.⁴⁴⁷ Os *miRNAs* são conhecidos por desempenharem papéis importantes em muitos processos fisiológicos e patológicos, incluindo a tumorigénese, função imunitária, metabolismo e em vários distúrbios neurodegenerativos, como doença de Parkinson, doença de Alzheimer, doença de Huntington e também na ELA.^{447,448}

Os *miRNAs* presentes no LCR podem reflectir as condições fisiológicas e patológicas do SNC, representando biomarcadores mais sensíveis que aqueles presentes em outros biofluidos.⁴⁴⁷ A presença de *miRNAs* no LCR foi demonstrada pela primeira vez por Cogswell e colegas.⁴⁴⁹ Os autores reportaram que a quantidade de *miRNAs* secretados ou excretados de outros órgãos para o LCR é muito limitada e que a principal fonte de *miRNAs* detectados no LCR são as células imunitárias presentes neste biofluido. Além disso, outros estudos mostraram que os *miRNAs* presentes no LCR provém dos neurónios.⁴⁵⁰ Uma vez que a punção lombar representa um procedimento invasivo e que dificilmente pode ser repetido durante o curso da doença, a análise de *miRNAs* no LCR não é adequada para monitorizar a progressão da doença. Várias evidências sugerem um envolvimento específico dos *miRNAs* na ELA, por exemplo, a perda de *Dicer* é suficiente para causar degeneração progressiva dos neurónios motores medulares,^{443,451} para além disso, a redução da regulação global de *miRNAs* é um denominador molecular frequente na ELA.⁴⁵² Outra abordagem comum é o papel nas vias de processamento de RNA associada a ELA.⁴⁵³

O perfil de *miRNAs* no LCR, soro e plasma de pacientes com ELA, foi realizado num número reduzido de estudos (Tabela 4), indicando a necessidade de mais investigação para validação dos resultados.

Tabela 4| MicroRNAs (*miRNAs*) expressos diferencialmente no líquido cefalorraquidiano (LCR), soro e plasma.

Adaptado: Vu *et al.* (2017).²¹⁴

<i>miRNA</i>	LCR	Soro	Plasma	Referência
<i>miRNA-15b-5p</i>	↓	NA	NA	Benigni, 2016 ⁴⁵⁴
<i>miRNA21-5p</i>	↓	NA	NA	
<i>miRNA195-5p</i>	↓	NA	NA	
<i>miRNA148a-3p</i>	↓	NA	NA	
Let7b-5p	↓	NA	NA	
<i>miRNA181a-5p</i>	↑	NA	NA	
Let7a-5p	↓	NA	NA	
Let7f-5p	↓	NA	NA	
<i>miRNA-132-5p</i>	↓	↓	NA	Freischmidt, 2013 ⁴⁵⁵
<i>miRNA-132-3p</i>	↓	↓	NA	
<i>miRNA-143-5p</i>	↑	↓	NA	
<i>miRNA-143-3p</i>	↓	↓	NA	
<i>miRNA-574-5p</i>	↑	NC	NA	De Felice, 2014 ⁴⁵⁶
<i>miRNA-338-3p</i>	↑	↑	NA	
<i>miRNA-1234-3p</i>	NA	↓	NA	
<i>miRNA-1825</i>	NA	↓	NA	
<i>miRNA-4649-5p</i>	NA	NA	↑	Takahashi, 2015 ⁴⁵⁸
<i>miRNA-4299</i>	NA	NA	↓	

Legenda da tabela: ↓ e ↑ representa diminuição e aumento dos níveis em pacientes com ELA vs controlos, respectivamente

NA = *miRNA* não foi quantificado em biofluidos

NC = Não foram observadas alterações

Biomarcadores de Neuroinflamação no LCR

Como anteriormente referido, os mediadores imunitários e inflamatórios têm um papel complexo na fisiopatologia da ELA. Enquanto a activação inicial da microglia e dos astrócitos pode ser neuroprotectora, um estado de activação crónica muda o equilíbrio para a neurotoxicidade, com regulação aumentada ou diminuída de uma ampla variedade de factores humorais e celulares.^{380,459} A neuroinflamação é uma característica comum das doenças neurodegenerativas e pensa-se que medeia a disseminação da doença desde o local de início até regiões anatomicamente contíguas.^{377,460,461,462} Este conceito de neuroinflamação, está, no entanto, longe de ser consolidado. Por exemplo, a concentração e a interacção entre diferentes citocinas vai variando no decurso da doença, em função do tempo de duração da mesma.⁴⁶³ Assim, diferentes células imunes e citocinas podem ter um papel dominante durante cada fase da doença.⁴⁶⁴

Análises proteómicas no LCR de pacientes com ELA, quando comparados com controlos saudáveis e controlos neurológicos, mostraram alterações em proteínas que estão envolvidas em respostas inflamatórias agudas, incluindo diferentes citocinas, quimiocinas e proteínas do complemento.^{377,465} Estas variações incluem aumentos e diminuições, indicando que muitos factores contribuem de forma independente para a respectiva regulação e que a neuroinflamação é um fenómeno modulado, em vez de um "*all-or nothing*".

Num estudo, Mitchell e colaboradores realizaram ensaio de ELISA Multiplex, para identificar potenciais candidatos a biomarcadores no LCR em pacientes com ELA. Observaram que as citocinas com a maior diferença entre ELA e controlos foram a IL-10, IL-6, GM-LCR, IL-2 e IL-15 e quando combinadas, deram uma precisão de diferenciação de 89%.⁴⁶⁶ Outros factores de diferenciação que foram identificados como folistatina, IL -1 α , calicreína-5⁴⁶⁷ e a quitotriosidase 1 (CHIT-1), C3, IL-17, bFGF, VEGF, MIP-1b, MIP-1 α , MCP-1 β e IFN- γ .⁴⁶⁷ Em termos de prognóstico, as IL-9, IL-5 e IL-12, revelaram-se preditores negativos e os MIP-1 β e G-CSF preditores positivos.^{380,468} Demonstrou-se, igualmente que o IFN- γ , assim como os bFGF, VEGF e MIP-1 α correlacionam-se com a duração da doença.⁴⁶⁷ Esse perfil imune promete subdividir pacientes com ELA e esclarecer a identificação de factores fisiopatológicos com a descoberta de possíveis alvos terapêuticos.³⁸⁰

Como referido anteriormente, uma característica comum entre muitas doenças neurodegenerativas é a activação glial acompanhada por níveis aumentados de mediadores inflamatórios, potenciando a neuroinflamação e a morte celular.⁴⁶⁹ A microglia tem um papel crucial nas vias neuroinflamatórias da ELA e acredita-se que sua activação contribua para a progressão da doença.⁴⁷⁰ Entre os marcadores de activação microglial, as enzimas quitinase e, mais especificamente, a CHIT1 foram investigadas recentemente. A CHIT-1 demonstrou aumento da expressão na microglia após a exposição ao LCR de pacientes com ELA, sugerindo seu papel na activação da microglia.⁴⁷¹ A actividade do CHIT1 foi maior no LCR^{407,472,473} e nas amostras de sangue periférico^{472,474} dos pacientes com ELA do que nos controlos saudáveis e os seus níveis parecem prever a progressão da doença.^{407,473}

Importa destacar dois estudos efectuados em amostras de LCR,^{407,473,474} os quais integraram controlos saudáveis e controlos neurológicos, incluindo doenças que mimetizam a ELA e outras doenças neurodegenerativas.³⁷⁷ A imuno-histoquímica (IHC) foi então realizada em tecido do SNC *post-mortem* de pacientes com ELA demonstrando a existência de microglia e macrófagos activados para CHIT nos tractos corticospinais. Os autores, portanto, concluíram experimentalmente que a CHIT pode ter um papel como marcador diagnóstico e prognóstico. Isto é corroborado por um recente estudo longitudinal de LC-MS que demonstrou que o CHIT1 e outras quitinases, proteína 1 semelhante à quitinase-3 (CHI3L1), e CHI3L2 (proteína 1 semelhante à quitinase-2 ou YKL-39), correlacionam-se com a progressão da doença e, de facto, com os níveis de NFH.⁴⁷³

Análises proteómicas recentes identificaram 248 proteínas no LCR de controlos saudáveis e pacientes com ELA que exibiam enriquecimento dos papéis biológicos relacionados com a cascata do complemento e inflamação aguda.^{214,465} Além disso, alguns estudos usando análises proteómicas do LCR também identificaram que respostas inflamatórias agudas e a activação do complemento estavam entre as principais vias alteradas no LCR em pacientes com ELA quando comparadas com controlos saudáveis e controlos com outras doenças neurológicas.⁴⁷⁵

Foi descrito que os níveis IL-6 se correlacionam com a severidade da hipóxia, na ELA,⁵²² sugerindo que os níveis de citocinas são dependentes da oxigenação, o que evidencia uma ligação entre hipóxia e inflamação nesta doença. Além de citocinas e quimiocinas extracelulares como biomarcadores para ELA, a presença de tipos de células inflamatórias activadas também podem ser utilizados como

potenciais biomarcadores. Os monócitos periféricos e as células T reguladoras entram no SNC e podem também modular a inflamação durante a ELA e desempenham papéis-chave na regulação da progressão da doença.^{525,526} O ponto de entrada dessas células parece ser a barreira hematoencefálica ou o plexo coróideu.⁵²⁷

Outros biomarcadores da inflamação, como a CHI3L1 (YKL-40) e a proteína-1 quimiotática de monócitos (MCP-1) foram observados estarem elevados no LCR de pacientes com ELA e são secretados por diferentes células gliais.^{464,473,476,477} Os mediadores inflamatórios que foram medidos no LCR de pacientes com ELA estão resumidos na tabela 5.

Tabela 5| Mediadores inflamatórios detectados no LCR de pacientes com esclerose lateral amiotrófica (ELA).

Adaptado de Vu *et al.* (2017).²¹⁴

Biomarcador	Resultado Importante	Referência(s)
CHIT-1	↑ Níveis e ↑ actividade	Varghese, 2013 ⁴⁷¹
	↑ Níveis	Chen, 2016 ⁴³⁸
Prostaglandina E2	NC	Moreau, 2009 ⁴⁷⁸
	↑ Níveis	Almer, 2002 ⁴⁷⁹ Hžecká, 2003 ⁴⁸⁰
VEGF	↑ Níveis	Mitchell, 2009 ⁴⁶⁶
	↓ Níveis	Moreau, 2009 ⁴⁷⁸
IL-6	↑ Níveis	Mitchell, 2009 ⁴⁶⁶ Moreau, 2005 ⁴⁸¹
GM-LCR	↑ Níveis	Mitchell, 2009 ⁴⁶⁶
IL-2	↑ Níveis	Mitchell, 2009 ⁴⁶⁶
IL-15	↑ Níveis	Mitchell, 2009 ⁴⁶⁶
IL-17	↑ Níveis	Mitchell, 2009 ⁴⁶⁶
MIP-1β	↑ Níveis	Mitchell, 2009 ⁴⁶⁶
FGF	↑ Níveis	Mitchell, 2009 ⁴⁶⁶
G-CSF	↑ Níveis	Mitchell, 2009 ⁴⁶⁶

Biomarcador	Resultado Importante	Referência(s)
MIP-1α	↑ Níveis	Mitchell, 2009 ⁴⁶⁶
MCP-1	↑ Níveis	Mitchell, 2009 ⁴⁶⁶ Kuhle, 2009 ⁴⁷⁶
IL-10	↓ Níveis	Mitchell, 2009 ⁴⁶⁶
IFN-γ	↓ Níveis	Mitchell, 2009 ⁴⁶⁶
IL-8	↑ Níveis	Kuhle, 2009 ⁴⁷⁶
Angiogenina	↓ Níveis	Moreau, 2009 ⁴⁷⁸
Angiopietina 2	NC	Moreau, 2009 ⁴⁷⁸
Follistatina	↓ Níveis	Lind, 2016 ⁴⁸²
IL-1α	↓ Níveis	Lind, 2016 ⁴⁸²
Calicreína-5	↓ Níveis	Lind, 2016 ⁴⁸²

Legenda da Tabela: ↓ e ↑ representam níveis diminuídos e aumentados em pacientes com ELA *versus* controlos respectivamente. CHIT1| quitotriosidase-1; NC| sem alteração observada; VEGF| factor de crescimento endotelial vascular; IL| interleucina; GM-CSF| factor estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos; MIP| proteína inflamatória de macrófagos; FGF| factor de crescimento de fibroblastos; G-CSF| factor estimulante de colónias de granulócitos; MCP1| proteína quimioatraente de monócitos 1; IFN| interferão

Biomarcadores Metabólicos e Stress Oxidativo no LCR

Existe evidência de numerosos mecanismos envolvidos na patogénese da ELA, associados a alterações em várias vias bioquímicas, incluindo disfunção mitocondrial, dano oxidativo, excitotoxicidade do glutamato e aumento metabolismo energético,⁴⁸³ a excitotoxicidade continua a ser um dos processos mais aceites na origem da doença.^{214,320,484,485,531-533} Alguns estudos descreveram níveis aumentados de glutamato no LCR de pacientes com ELA,⁴⁸⁶⁻⁴⁹⁰ mas outros investigadores negaram estes resultados.^{491,492,536} No entanto, medições das concentrações de glutamato no LCR em resposta à terapêutica ainda precisam ser exploradas e, portanto, investigação adicional é ainda necessária.

Níveis de expressão do receptor de glutamato 4 (GRIA4) no LCR foram medidos e observou-se um aumento na ELA, correlacionado-se negativamente com a gravidade da doença, sugerindo um aumento precoce da expressão. Tal facto, enquadra-se com a excitotoxicidade do glutamato como um factor no dano neuronal e indica que a terapia anti-glutamatérgica, como o Riluzol, pode ser mais efectiva no início do curso da doença.^{380,465}

Biomarcadores oxidativos que foram identificados como aumentados em pacientes com ELA são 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8OH2'dG) e 15-F (2t) -isoprostano na urina,³²⁶ 8OH2'dG e 3-nitrotirosina no LCR^{493,494} e 4-hidroxi-2,3-nonenal no soro e no LCR.⁴⁹⁵ No entanto, nenhum ainda foi validado para uso em ensaios clínicos.³⁸⁰ A glutathione é outro marcador útil de stress oxidativo, pois actua como um tampão para as ROS. Níveis séricos reduzidos foram observados quando comparados pacientes com ELA e controlos.^{380,496} Outro estudo demonstrou um maior potencial de oxidação - redução (ORP) no LCR em pacientes com ELA e uma correlação negativa com a escala funcional ALSFRS-R em pacientes com início medular, levando os autores a concluir que pode ser um marcador de progressão da doença.^{380,497}

Os níveis de colesterol no LCR de pacientes com ELA estão aumentados em comparação com os controlos. Muitos outros metabolitos derivados do colesterol estão alterados, principalmente reduzidos no LCR de pacientes com ELA. Especificamente, 3 β ,7 α -Dihydroxychol-5-en-24-oic acid (3 β ,7 α - Δ 5-BA), seu precursor ácido 3 β ,7 α -Dihydroxycholest-5-en-26-oic (3 β ,7 α -diHCA) e seu produto ácido 7 α -Hydroxy-3-oxocholest-4-en-26-oic (7 α H,3O- Δ 4-BA) quando normalizado

aos níveis de colesterol do LCR são altamente reduzidos em pacientes com ELA.⁴⁹⁸ Outras moléculas reduzidas no LCR de pacientes com ELA incluem o 24-HC e o 25-D3 (vitamina D3 activa).⁴⁹⁸ Dentre os metabolitos do colesterol, o 26-HC é o que apresenta uma redução de maior número de vezes no soro de doentes com ELA.⁴⁹⁹

A metabolómica baseada na espectrometria de massa tem sido usada para descobrir assinaturas metabólicas em pacientes com ELA. Num estudo, Wuolikainen e colaboradores examinaram o LCR de pacientes com ELA com mutações no gene da SOD1 e identificaram perfis metabólicos distintos para mutações específicas da SOD1, sendo os principais metabolitos diferenciais a arginina, lisina, ornitina, serina, treonina e ácido piroglutâmico.⁴⁹⁹

Num estudo mais recente, do mesmo grupo, combinando múltiplas metodologias de espectrometria de massa, foi descrito um aumento da creatina e diminuição dos níveis de creatinina no LCR de pacientes com ELA.^{214,499} Conquanto o grande ensaio clínico de fase III do dextramipexol tenha falhado em demonstrar eficácia, uma análise *post hoc* identificou que a perda de creatinina se correlacionava com a progressão da doença e esta perda foi reduzida em pacientes tratados com dextramipexol.⁵⁰⁰ Este resultado suporta a investigação continuada relativamente a creatina e creatinina no sangue e LCR, como potenciais biomarcadores prognósticos para ELA.²¹⁴

O ácido úrico é um antioxidante fisiológico no sangue e no LCR e uma vez que se pensa que o *stress* oxidativo desempenha um papel na patogénese da ELA, diferentes grupos têm-se concentrado no estudo desse metabolito. Vários estudos reportaram uma menor concentração de ácido úrico sérico na ELA, em comparação com controlos, embora outras doenças neurodegenerativas tenham mostrado uma associação semelhante, incluindo a doença de Parkinson e Huntington.⁵⁰⁰⁻⁵⁰⁴ Investigando o maior repositório de ensaios clínicos de ELA registados e disponível publicamente,⁵⁰⁵ “*the Pooled Resource Open-Access ALS Clinical Trials (PRO-ACT) database*”, um grupo de investigadores⁵⁰⁶ mostraram que valores iniciais mais elevados de níveis de ácido úrico foram preditores independentes de uma progressão mais lenta da doença e uma sobrevida mais longa. Outros autores confirmaram estes resultados.^{502,504}

Numa revisão Blasco e colaboradores descreveram mais detalhadamente o grande número de metabolitos descobertos.⁵⁰⁷ Num outro estudo do mesmo autor, investigaram o perfil lipídico do LCR de pacientes com ELA,⁵⁰⁸ observando que na ELA existe um perfil lipídico distinto e que, com base na análise inicial do LCR, poderiam fornecer um modelo preditivo com 71% de precisão para a progressão da doença, fornecendo assim um potencial biomarcador diagnóstico e prognóstico.⁵⁰⁸

2.1.2.2. Biomarcadores do Sangue (Soro e Plasma)

Embora vários estudos tenham identificado biomarcadores no LCR no decurso de intensa investigação, assumimos como provável que os mesmos biomarcadores possam ter relevância no sangue, tendo em conta a transferência molecular entre o sangue e o LCR, predominantemente no espaço subaracnóideo e no plexo coróideu.^{214,509,510} Na verdade, têm sido encontradas, em geral, correlações significativas entre os valores do sangue (soro e plasma) e do LCR para o mesmo biomarcador.^{214,409,456,511} No entanto, outros resultados identificaram resultados díspares, indicando que esses dois fluidos são regulados independentemente.^{214,439} Os biomarcadores no sangue podem também ser originados de outros órgãos afectados na ELA, das células do sangue periférico ou de músculos em degeneração. A facilidade de obter sangue em comparação com LCR, torna o sangue uma opção mais conveniente.²¹⁴

C9orf72, SOD1 e TDP-43

Embora a maioria dos estudos inclua *outcomes* no LCR,⁵¹² o nível de *SOD1* decresce nos leucócitos,⁵¹² mas não nos eritrócitos,⁵¹² em resposta ao tratamento com pirimetamina na mutação *SOD1* e repetições poli (GP) foram detectadas em lisados de células mononucleares do sangue periférico em doentes com a mutação *C9orf72*, embora os níveis não tenham sido comparados com os do LCR.⁵¹³ A TDP-43 está presente no sangue e no LCR de pacientes com ELA; no entanto, a origem e a relevância clínica destes valores é incerta.⁴²⁴ O papel da TDP-43 ainda não está esclarecido; parece derivar da deslocalização para o citoplasma nas células mononucleares circulantes⁵¹⁴ e embora o nível total de TDP-43 não seja discriminativo,^{514,515} os níveis tendem a estar aumentados na ELA.⁵¹⁵

Um outro estudo encontrou níveis aumentados de TDP-43 fosforilado no plasma e no LCR em pacientes portadores da expansão *C9orf72*.⁵¹⁶ Contrariamente a esses

resultados, os níveis de TDP-43 nos linfo-monócitos circulantes foram aproximadamente os mesmos nas células portadoras da mutação TDP-43, que nas células sem mutação e nos controlos.⁵¹⁴ No entanto, dadas as limitações dos imunoensaios actuais do TDP-43, a potencial utilidade do biomarcador de TDP-43 no sangue permanece incerta.

Neurofilamentos de Cadeias Pesadas Fosforiladas (NFH) e Neurofilamentos de Cadeias Leves (NFL)

Com o sucesso na validação dos neurofilamentos no LCR como biomarcadores da ELA, o NFH e o NFL também foram examinados como biomarcadores sanguíneos, quer no soro e no plasma.

Níveis mais elevados de NFH plasmático foram observados em pacientes com ELA, quando comparados com controlos saudáveis. Em geral esta medição é discriminativa no diagnóstico diferencial com outras doenças neurológicas.^{517,565} Os níveis do NFH no sangue correlacionam-se com os níveis no LCR.⁵¹⁸ Sendo que, tal como documentado para o LCR, níveis mais elevados foram associados a mau prognóstico, mas sem correlação com os critérios diagnósticos do *E/ Escorial*.⁵¹⁴ Um estudo longitudinal não mostrou uma trajectória previsível do NFH plasmático ao longo do tempo: os níveis aumentaram, diminuíram ou permaneceram estáveis à medida que a doença progrediu.³⁹¹ Enquanto que num subgrupo de doentes com progressão mais rápida, os níveis estavam mais elevados no início e diminuíram com o tempo. No geral, observa-se marcada variabilidade entre os indivíduos, nos estudos longitudinais, tendendo a serem estáveis.^{519,564} Nos portadores assintomáticos de mutações patogénicas os níveis são normais.⁵¹¹

Assim, o NFL parece ter utilidade como marcador diagnóstico e prognóstico. Deve ser considerado que poucos estudos testaram o desempenho diagnóstico do NFL em comparação com as doenças que mimetizam a ELA,^{390,399,520} os resultados são positivos, mas inferiores relativamente aos obtidos pela medição deste neurofilamento no LCR e ao NFH no sangue.^{397,399,521}

Ambos, NFL e NFH são os biomarcadores mais promissores na ELA.³⁹³

MicroRNA (*miRNA*)

Além dos *miRNAs* no LCR, os *miRNAs* têm sido estudados como possíveis biomarcadores, no sangue total,^{456,522} soro^{457,522-524} e plasma,^{458,525} devido ao seu papel na regulação da expressão génica.

No sangue total, foram identificados, seis *miRNAs* regulados negativamente e um *miRNA* regulado positivamente⁴⁴² e um estudo posterior confirmou a regulação positiva de *miRNA* -338-3p no soro e em leucócitos (bem como no LCR e na medula espinhal).⁴⁵⁶ Diminuições significativas do *miRNA*-1234-3p foram observadas apenas em soros de pacientes com SALS em comparação com controlos saudáveis, mas nenhuma diferença significativa foi observada em soros de pacientes com FALS quando comparados com controlos de indivíduos saudáveis.⁴⁵⁷ Tal sugere que *miRNA* -1234-3p pode permitir o diagnóstico específico de SALS.

Num trabalho,⁴⁵⁸ estudando o plasma, reportam-se níveis aumentados de hsa-*miRNA*-4649-5p e níveis reduzidos de hsa-*miRNA*-4299 em pacientes com ELA quando comparados com controlos, mas não encontraram nenhuma variação significativa ao longo do tempo. O *miRNA*-4649-5p plasmático está aumentado, mas estável, em pacientes com SALS, correlacionando-se negativamente com a duração da doença.⁴⁵⁸ Similarmente, um segundo estudo, utilizando amostras de plasma, identificou uma regulação positiva, constante longitudinalmente, de dois *miRNAs* diferentes,⁵²⁵ em que o *miRNA*-206, também está aumentado no soro.⁵²² O *miRNA* -206 sérico também estava aumentado num estudo que também reportou um aumento no *miRNA* -143-3p e diminuição no miR-374b-5p, quando comparado com os controlos.⁵²³

Ambos, *miRNA*-424 e *miRNA*-206 têm uma expressão significativamente maior no plasma de pacientes na ELA quando comparados com controlos saudáveis.⁵²⁵ Curiosamente, os níveis de *miRNA*-424 correlacionaram-se significativamente com o score da escala de força muscular modificada de MRC (*Medical Research Council*), que é uma medida da integridade do LMN, indicando a sua potencial utilização na estratificação do paciente. Os autores, consideram que os *miRNA* -424 e *miRNA*-206 são potenciais marcadores prognósticos para ELA.⁵²⁵ Adicionalmente, este estudo longitudinal, reportou que os níveis de *miRNA*-206

permaneceram estáveis, enquanto os níveis de *miRNA* -143-3p aumentaram e os níveis de *miRNA*-374b-5p diminuíram ao longo do tempo. Nesse estudo, observaram que o Riluzol não tinha efeito nos níveis *miRNA*. Outros trabalhos identificaram outros painéis de *miRNAs* diferencialmente expressos no soro de pacientes com ELA, quando comparados com os controlos,⁵²⁶ e também comparando com outras doenças neurológicas.⁵²⁶ Observaram mudanças longitudinais em conjuntos separados de *miRNAs*⁵²⁶ e maior variabilidade na doença esporádica⁵²⁶ quando comparados com casos de doença familiar. Curiosamente, um estudo identificou 30 *miRNA* negativamente regulados na ELA, 22 dos quais foram igualmente regulados negativamente em portadores de mutações pré-sintomáticas de ELA, com alguns mostrando um maior grau de regulação negativa após o início da doença.⁵²⁶ Os *miRNA* parecem ser promissores como biomarcadores, mas há uma falta de sobreposição nos *miRNA* identificados em diferentes grupos de estudo e, até ao momento, poucos estudos longitudinais foram reportados.³⁸⁰

Biomarcadores Inflamatórios

Vários marcadores sanguíneos de actividade imunológica foram estudados na ELA. Resultados semelhantes aos encontrados no LCR de pacientes com ELA, foram observados igualmente no sangue. Aumentos nos níveis de factores inflamatórios como a IL-6 e IL-8 foram observados em pacientes com ELA.^{496,527,528}

Em dois estudos originais, integrados nesta tese, foram observados níveis aumentados de IL-6 e de *Club Cell secretoty protein* (CC-16) na população de pacientes de ELA, quando comparados com grupo controlo de indivíduos saudáveis (vd. “Capítulo Resultados”). Estes marcadores inflamatórios estão associados à IR e a um pior prognóstico.^{527,529}

A identificação de biomarcadores inflamatórios de prognóstico também foi realizada utilizando plasma de pacientes de ELA. Foram observados níveis aumentados da ferritina, factor de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e IL-13, enquanto o interferão- γ (IFN- γ) estava diminuído, em estudos transversais.^{462,528,575} Uma recente meta-análise,⁵³⁰ que combinou quantificações séricas e plasmáticas de 25 estudos, observaram níveis significativamente mais elevados de TNF- α , receptor TNF 1, IL-6, IL-1 β , IL-8 e VEGF na ELA, destacando-se o facto de os resultados para IL-1 β , IL-6 e VEGF

poderem ter sido distorcidos por um estudo.³⁸⁰ Os níveis de citocina não se alteraram ao longo do decurso da doença.⁵⁷⁵ Estes biomarcadores periféricos não indicam apenas processos inflamatórios na ELA, mas também pode ser usado para distinguir pacientes com ELA de pacientes com outras doenças neurológicas⁵³¹ e para o prognóstico.^{531,532}

Além dos factores inflamatórios, os níveis do factor de crescimento transformante- β 1 (*transforming growth factor beta*-TGF- β 1) estão aumentados no plasma de pacientes com ELA, quando comparados com os controlos e correlacionam-se positivamente com a duração da doença.^{214,533} Observações semelhantes, foram também observadas no soro em que as concentrações de TGF- β 1 foram superiores nos pacientes com ELA do que nos controlos.^{214,534} Dado que um dos mecanismos patológicos da ELA é a inflamação, essas observações parecem contra-intuitivas para o que seria esperado, já que o TGF- β 1 é um mediador anti-inflamatório e, portanto, parece atenuar a neuroinflamação. Vários estudos demonstram que a sinalização de TGF- β também protege os neurónios da excitotoxicidade mediada por glutamato, um mecanismo reconhecido como subjacente à patogénese de vários distúrbios neurodegenerativos, como a ELA.⁵³⁵ Estudos recentes reportaram desregulações do sistema TGF- β como uma característica comum dos distúrbios neurodegenerativos. A regulação positiva desse sistema tem sido associada à progressão da ELA e ao aumento das citocinas pró-inflamatórias, sugerindo uma mudança da resposta neuroprotectora para uma resposta imune neurotóxica. Contrariamente, com as propriedades anti-inflamatórias agudas do TGF- β , uma actividade sistémica persistente elevada pode promover a progressão da ELA pela interacção com três sistemas diferentes, nomeadamente: (i) a resposta imune, (ii) a actividade do nicho neurogénico adulto e (iii) cicatrização fibrótica.⁵³⁶

Num estudo no qual os autores quantificaram os níveis de múltiplas células imunitárias e diferentes marcadores de superfície, de modo a originar fenótipos imunitários para pacientes com ELA familiar e esporádica,⁵³⁷ foi reportado que os doentes tinham uma actividade imunológica aumentada e que poderiam ser agrupados em dois perfis imunológicos distintos. Os pacientes do perfil 1 eram razoavelmente semelhantes aos voluntários saudáveis, mas os pacientes do perfil 2 apresentavam níveis elevados de leucócitos totais e células mononucleares, bem como células CD3 +, CD4 +, CD8 +, CD4 + CD28 +, CD3 + CD56 + e T CD8 +

CD45RA +, células T nativas. O perfil 2, foi associado a idade mais jovem, ELA familiar e sobrevida maior (média de 344 semanas, vs 184 semanas para o Perfil 1). Nos perfis, diferentes fenótipos de leucócitos influenciaram a sobrevida; por exemplo, os pacientes do Perfil 1 com níveis mais elevados na contagem de células T CD1 + CD4 T sobreviveram por mais tempo, enquanto os pacientes do Perfil 2 com mais células T CD3 + CD56 + sobreviveram por menos tempo.^{380,537} Um outro estudo, identificou que os níveis de leucócitos, monócitos e células *NK* estavam elevados em pacientes com ELA, tendo aumentado com o tempo. Um aumento no total de leucócitos e neutrófilos e uma diminuição nas células TCD4 foram correlacionados com um menor valor na escala funcional ALSFRS-R.⁵⁸⁴ Além de citocinas e quimiocinas extracelulares, os monócitos periféricos podem entrar no SNC e serem detectados em tecidos *post-mortem* de pacientes com ELA.⁵³⁸

As células T regulatórias (*Treg*) representam um candidato promissor a biomarcadores e um possível alvo terapêutico. Essas células suprimem vários componentes da resposta imunológica, incluindo a produção de citocinas e a proliferação de linfócitos T. Também modulam a inflamação dentro do SNC, onde a redução da expressão de FoxP3, um factor de transcrição necessário para a função reguladora das células T, se correlaciona com a progressão da doença e sobrevida dos pacientes com ELA.⁵⁸⁶ Um estudo reportou que os níveis de CD4 + CD25 *High Tregs* estavam reduzidos na ELA e que o número de *Tregs* foi inversamente correlacionado com a taxa de progressão da doença.⁵⁸⁶ Noutro estudo, observaram que os *Tregs* de pacientes com ELA tinham capacidade reduzida de suprimir a actividade dos linfócitos T e que a disfunção de *Treg* estava correlacionada com a taxa de progressão da doença.⁵²⁵ Estes resultados suportam a potencial utilização de *Tregs* como um potencial biomarcador de prognóstico.

Os produtos de activação do complemento estão igualmente aumentados em amostras de sangue de pacientes com ELA; especificamente a cadeia C3b- α no soro⁵⁸⁷ e C5b-9⁵⁸⁸ e C5a^{587,588} no plasma, juntamente com uma ampla gama de factores do complemento no plasma.⁵⁸⁹ Outros marcadores inflamatórios mostraram resultados variados, como a proteína C reactiva (PCR) que num trabalho não apresentou diferenças no sangue total ou no plasma.⁵³⁹ Mas noutro estudo a PCR sérica estava aumentada na ELA e correlacionava-se com a escala ALSFRS-R e sobrevida.⁵⁴⁰ A CHIT1, expressa por macrófagos teciduais activos,

encontrava-se aumentada em pacientes com ELA, quando comparado com indivíduos saudáveis e níveis mais elevados foram encontrados naqueles com progressão mais rápida da doença.⁵⁴⁰ No entanto, outros não encontraram alterações nos níveis séricos de CHIT1 na ELA, quando comparados com controlos, enquanto que os valores no LCR se correlacionaram com a progressão e gravidade da doença.⁴⁴⁴

Não está claro se o perfil imunitário alterado na ELA está relacionado com a fisiopatologia da doença ou a uma resposta à actividade da doença.

Biomarcadores de Desinervação Muscular

Têm sido reportados valores mais baixos de creatinina sérica na ELA, embora alguns estudos tenham encontrado níveis diferentes consoante o local anatómico inicial de envolvimento da doença,^{380,541} ou o género.⁵⁴² A maioria dos estudos relaciona os níveis de creatinina com o prognóstico da doença, com valor preditivo de sobrevida, nomeadamente tomando o valor medido na primeira consulta.^{33,500,504,541-543}

Numa análise recente, que envolveu mais de 1.200 pessoas com ELA, foram encontradas elevadas correlações longitudinais entre creatinina sérica e o score da escala funcional ALSFRS-R, força muscular e mortalidade geral, indicando que a avaliação da creatinina sérica em ensaios com mais de 18 meses de duração permitiria uma redução do tamanho da amostra, em 21,5%.^{33,380}

Num estudo efectuado pelo nosso grupo, cujo trabalho se encontra nesta tese, objectivamos estudar o papel da creatinina como um marcador preditivo da disfunção respiratória na nossa população, bem como avaliar o seu valor preditivo no que respeita à progressão clínica e morte. Na nossa população, a creatinina apresentou um valor preditivo da capacidade funcional, mas não para a disfunção respiratória ou para a morte (resultados ainda não publicados e descritos mais à frente nesta tese (vd “Capítulo Resultados”).

Apesar da creatinina plasmática representar um potencial biomarcador clínico para o prognóstico da ELA, devem ser considerados estes resultados promissores com cautela. Tal deriva das diferenças metodológicas e existência de factores confundentes, como o IMC, a influência do género e as técnicas analíticas.⁵⁴⁴

A creatina quinase (CK) sérica, mostrou-se igualmente útil como biomarcador de desinervação muscular, geralmente encontra-se aumentada no soro e no plasma^{380,543} e, em alguns estudos, correlaciona-se com a sobrevida.^{543,545} A base de dados PRO-ACT revelou que os pacientes que apresentavam uma progressão lenta da doença tinham um CK estável ou um declínio lento, enquanto que a progressão mais rápida da doença estava associada a valores que decresciam rapidamente. De facto, associada com a diminuição do peso, da albumina e da fosfatase alcalina, o declínio dos níveis de CK foi capaz de prever a progressão da doença lenta *versus* rápida.^{380,546}

Biomarcadores Metabólicos

Num estudo, no qual foram quantificadas as concentrações de aminoácidos no plasma de pacientes com ELA, foi descrito níveis aumentados de glutamato e lisina, enquanto os níveis de leucina estavam reduzidos.⁵⁴⁷ Níveis aumentados de glutamato plasmático tinham correlação positiva com a duração da doença,⁵⁴⁸ e associavam-se a doentes medulares e do sexo feminino.⁵⁴⁹ Curiosamente, apesar do tratamento com Riluzol ter impacto na sobrevida, não parece reduzir os níveis de glutamato ou glicina no plasma,⁵⁴⁹ embora um estudo tenha reportado uma redução das concentrações de glutamato e aminoácidos após um tratamento de 6 meses com Riluzol.⁵⁵⁰

Um grande projecto metabolómico, multicêntrico, no qual os autores utilizaram amostras de plasma de mais de 250 doentes, foi identificado um painel de 32 proteínas capazes de diferenciar doentes com ELA de controlos saudáveis e de doentes com outras doenças.⁵⁵¹ Neste painel de biomarcadores metabólicos do plasma, foram considerados, os seguintes analitos: creatina, creatinina, urato, glutamina e piroglutamina.⁵⁵¹ Embora estudos de validação adicionais sejam necessários, esses estudos sugerem que alterações metabólicas específicas podem ser identificadas em pacientes com ELA e que contribuem para a progressão da doença e a sobrevida dos pacientes.

Embora muitos grupos tenham realizado análises de espectrometria de massa no sangue, não há frequentemente uma sobreposição nas proteínas específicas identificadas. No entanto, são conhecidas as vias que estão desreguladas e que estão implicadas na ELA.⁵⁵²⁻⁵⁵⁵

Um trabalho recente, demonstrou uma regulação negativa de lípidos/colesterol e das vias de coagulação, inibição da produção de NO e ROS em macrófagos e aumentos na resposta de fase aguda e no sistema complemento.⁵⁵⁶ Estas assinaturas metabólicas estão cada vez mais a atrair a atenção da comunidade científica, pois fazem parte de grandes bancos de dados de ensaios clínicos já realizados e estão a ser utilizadas no desenvolvimento de algoritmos diagnósticos e prognósticos que serão úteis na investigação clínica.³⁷⁷

Os marcadores de carboidratos e metabolismo lipídico têm sido estudados extensivamente, embora com resultados contraditórios.⁵⁵⁷ Num grande estudo com duração de 20 anos, realizado na Suécia, incluindo 623 doentes, foram descritos valores mais baixos de glucose sérica e níveis mais elevados de colesterol e da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), da apolipoproteína B (apoB), assim como a razão apoB/apoA-I.⁵⁵⁷

Um grande estudo de 2014, que incluiu 638 pacientes com ELA, indicou a utilidade da redução da albumina sérica no diagnóstico e como um biomarcador de sobrevida. Maior sobrevida foi observada com níveis crescentes de albumina.^{542,608} Mais convincentemente, estudos longitudinais da ELA a partir do banco de dados PRO-ACT⁵⁴⁶ mostrou que o declínio da albumina era um dos quatro factores indicadores do ritmo de progressão da doença.⁵⁴⁶ A albumina sérica diminuída, correlacionou-se igualmente com os leucócitos totais aumentados, neutrófilos e monócitos no sangue, sugerindo ainda que a albumina sérica diminuída foi o resultado de um processo inflamatório. Estudos longitudinais, acerca da variação dos níveis sanguíneos de albumina, devem esclarecer a potencial utilidade prognóstica deste candidato a biomarcador.⁵⁵⁸

Biomarcadores de Stress Oxidativo

Um aumento nos níveis de ferritina foi observado no plasma e soro de pacientes com ELA, sugerindo uma desregulação do metabolismos do ferro, favorecendo o *stress* oxidativo;^{468,541,559} em alguns estudos, os níveis mais elevados foram associados a pior prognóstico,^{462,541} mas não em todos.⁴⁶⁸

O ácido úrico é um poderoso antioxidante e, portanto, níveis elevados podem ser úteis para reduzir o *stress* oxidativo observado na ELA. Em estudos transversais, os níveis séricos estão diminuídos em comparação com controlos saudáveis.^{501,502,560,561} Níveis elevados de ácido úrico sérico, correlacionam-se com

um risco moderadamente reduzido de desenvolvimento futuro da ELA,⁵⁶² mas a sua ligação com o aumento da sobrevida é menos conclusiva, com alguns resultados positivos.^{560,614} No entanto, uma publicação recente decorrente da análise da base de dados do PRO-ACT, incluindo 1.736 casos de ELA, mostrou uma redução de 11% no risco de morte para cada aumento de 1 mg/dL no ácido úrico sérico.⁵⁶³

2.1.2.3. Biomarcadores de Urina

Há uma quantidade limitada de estudos que recorreram à urina, como biofluido, em pacientes de ELA. Os estudos sobre biomarcadores urinários na ELA, incluem pequenos estudos transversais, muitas vezes com resultados contraditórios, tal como aqueles sobre oligoelementos urinários.⁵⁶⁴⁻⁵⁶⁶ Até onde sabemos, somente o receptor de neurotrofina p75 (p75ECD),⁵⁶⁷ glicosilgalactosil hidroxilisina (Glu-Gal Hyl),⁵⁶⁸ colagénio tipo IV,⁵⁶⁹ 8OH2'dG^{326,493} e F2-isoprostano (8-iso-PGF2 α),³²⁶ foram explorados como potenciais biomarcadores.

Em estudos transversais, o marcador de *stress* oxidativo, o 8OH2'dG, um produto de oxidação de DNA nuclear e mitocondrial, encontrava-se aumentado em pacientes com ELA.^{566,569} Tal aumento, mostrou-se consistente nos pacientes com ELA, estudados longitudinalmente durante um período de 9 meses (2,9 ng/mg de creatinina/ano), diferentemente dos controlos.⁴⁹³ A alteração nos níveis de 8OH2'dG na urina foi negativamente correlacionada com os *scores* da escala funcional ALSFRS-R, sugerindo que a 8OH2'dG poderia servir como um possível marcador prognóstico. Observações semelhantes foram observadas num outro estudo; no entanto, neste último não existia relação entre os níveis de 8OH2'dG e os *scores* da escala funcional ALSFRS-R.³²⁶

O F2-isoprostano (8-iso-PGF2 α) está também aumentado na urina de pacientes com ELA,³²⁶ mas a existência de uma via induzida por inflamação para geração de F2-isoprostano, além da peroxidação lipídica, precisa ser considerada para a interpretação dos resultados.^{380,570}

A degradação do colagénio resulta na excreção dos metabolitos Glu-Gal Hyl e galactosil hidroxilisina na urina, tornando estes biomarcadores viáveis para estudo na ELA.⁵⁶⁸ O Glu-Gal Hyl exibiu níveis reduzidos nos pacientes de ELA, quando comparados com controlos de doenças neurológicas e indivíduos saudáveis, e

diminuíram continuamente ao longo da doença, mas não se observaram alterações nos níveis de galactosil hidroxilisina. Esses resultados suportam estudos anteriores que detectaram redução dos níveis de colagénio no tracto corticoespinal e no corno anterior na medula espinhal em doentes com ELA.⁵⁷¹

Sabe-se que o p75ECD estimula a sobrevivência celular em resposta a factores de crescimento (neurotrofinas). Mais recentemente, um aumento p75ECD foi observado na urina de pacientes com ELA em comparação com indivíduos saudáveis, ou a pacientes com doença de Parkinson e a esclerose múltipla (EM), o aumento foi crescente ao longo da doença (2,3 ng/mg de creatinina/ano).^{567,572,573} Este biomarcador fornece potenciais vantagens prognósticas, em particular quanto ao declínio funcional, de tal forma que pacientes com ELA de progressão rápida, exibiram níveis mais elevados de p75ECD.^{567,572} Tendências semelhantes também foram observadas no rato transgénico com mutação SOD1^{G93A} quando comparados com o rato sem mutação (*wild type*). Importa ressaltar, que embora os sintomas da ELA no rato transgénico SOD1^{G93A} apareçam após 100 dias, a p75ECD estava elevada 40 dias antes, ou seja, na fase assintomática.⁵⁶⁷ Num estudo de *coorte* efectuado na China, a análise de urina foi realizada em 101 pacientes com ELA, 108 pacientes com outras doenças neurológicas (doença de Parkinson e Esclerose Múltipla) e em 97 controlos saudáveis,⁵⁷³ o p75ECD estava aumentado no grupo de ELA, quando comparado com os restantes.

Esses resultados sugerem que a p75ECD urinária poderá ter utilidade como biomarcador prognóstico e farmacodinâmico nos pacientes com ELA. Mas, estes resultados, bastante recentes e promissores, necessitam de ser confirmados por estudos multicêntricos, uma vez que esse biomarcador foi estudado por poucos grupos de investigação.^{567,573}

2.1.2.4. Biomarcadores na Saliva

Do mesmo modo dos estudos que envolvem biomarcadores baseados em urina, há relativamente poucos estudos que investigaram potenciais biomarcadores na saliva, e que estão sumarizados na Tabela 6.

Estes estudos têm-se baseado em marcadores que são sintetizados pelo sistema endócrino, sugerindo o potencial envolvimento do sistema endócrino na patogénese da ELA. No entanto, num estudo, os níveis de cromogranina A não se correlacionaram com muitas das medidas do questionário funcional.^{214,574}

Dada a quantidade limitada de informações usando este biofluido, facilmente obtido, estudos futuros deveriam focar-se na identificação de biomarcadores adicionais em amostras representativas.²¹⁴

Tabela 6| Biomarcadores endócrinos estudados na saliva na esclerose lateral amiotrófica (ELA).

Proteína	Função	Níveis em pacientes com ELA vs controles	Correlações (±)	Referência
Cromogranina A	Marcador de stress endócrino	Aumento (controles = ELA moderada, demência vascular e saudável)	+ com humor	Obayashi, 2008 ⁵⁷⁴
Cortisol	Hormona esteróide	Diminuído em 30 minutos após o despertar	+ com medidas da escala funcional ALSFRS e força muscular - com humor depressivo	Roosendaal, 2012 ⁵⁷⁵

Legenda da tabela: ALSFRS|Escala de Avaliação Funcional da ELA. Adaptado de Vu *et al* (2017).²¹⁴

Relativamente aos vários estudos abordados nesta tese, muitos biomarcadores demonstraram utilidade diagnóstica e prognóstica na ELA. No entanto, alguns desses biomarcadores podem não ter a especificidade e sensibilidade suficiente para o diagnóstico diferencial.

Na Tabela 7 estão reportados os resultados dos 5 principais biomarcadores com dados publicados sobre sensibilidade e especificidade na ELA.²¹⁴

Tabela 7| Os cinco biomarcadores de diagnóstico mais investigados na ELA

Analito	Biofluido	Informação do paciente	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Referência
NFH	LCR	40 ELA; 40 não- ELA CD	97,3	83,8	Chen, 2016 ⁴³⁸
NFH	LCR	253 DNM; 85 CD	83,0	80,0	Steinacker, 2016 ³⁹⁸
NFH	LCR	71 ELA; 52 CD; 40 CS	87,7	93,7	Ganesalingam, 2013 ⁵⁷⁶
NFH/C3	LCR	71 ELA; 52 CD; 40 CS	87,7	94,6	Ganesalingam, 2013 ⁵⁷⁶
NFL	LCR	254 DNM; 85 CD	77,0	88,0	Steinacker, 2016 ³⁹⁸
NFL	CSF	64 ELA; 36 CS	97,0	95,0	Lu, 2015 ³⁹¹
NFL	Soro	64 ELA; 36 CS	89,0	75,0	Lu, 2015 ³⁹¹
NFL	Plasma	103 ELA; 42 CS	90,0	71,0	Lu, 2015 ³⁹¹
Combinação de IL-10, IL-6, GM-CSF, IL-2, e IL-15	LCR	41 ELA; 33 CD	87,5	91,2	Mitchell, 2009 ⁴⁶⁶
p75ECD	Urina	28 ELA; 12 CS	93,0	100,0	Shepherd, 2014 ⁵⁶⁷
p75ECD	Urina	28 ELA; 19 CD	93,0	79,0	Shepherd, 2014 ⁵⁶⁷

Legenda da tabela: NFH|Neurofilamento fosforilado de cadeia pesada; LCR|Líquido cefalorraquidiano; CD|Controlos doentes; DNM |Pacientes com doença do neurónio motor; CS|Controlos saudáveis; NFL| Neurofilamento de cadeia leve; IL|Interleucina; GM-CSF|Factor estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos; p75ECD |Receptor de neurotrofina p75. Adaptado de Vu *et al.* (2017). ²¹⁴

2.1.2.5. Biomarcadores de Pele

Existe uma origem embrionária comum da pele e dos tecidos nervosos, ectoderme, e provavelmente por isso, em muitas doenças neurodegenerativas existem alterações na pele. Mais importante, por vezes as manifestações na pele precedem o aparecimento de sintomas neurológicos.^{577,578} Alterações cutâneas na ELA foram reportadas pela primeira vez por *Charcot* no século XIX, quando ele observou que os pacientes com ELA não apresentavam escaras.⁵⁷⁸ As alterações cutâneas na ELA incluem alterações no diâmetro e densidade da fibra de colagénio, assim como alterações na ligação cruzada de colagénio e elastina.⁵⁷⁸

Como a IL-6 é um factor pró-inflamatório, foram detectados níveis aumentados de IL-6 na pele de pacientes com ELA, o que poderia representar uma resposta inflamatória sistémica.⁵⁷⁸

A expressão nuclear do gene *FUS* está aumentada nas células epidérmicas de pacientes com SALS, sendo crescente com a progressão da doença, mas tem baixa especificidade.⁵⁷⁹ No entanto, depósitos de TDP-43 nas mesmas células podem ser uma marca da doença (positivos em cerca 97% dos casos, excepto na ELA causada por variantes patogénicas do gene *SOD1*). O recurso a biópsias de pele merece uma investigação mais aprofundada.

Recentemente um grupo de investigadores, desenvolveu um modelo único de engenharia de tecidos aplicado na ELA (ALS-TES), a partir de células do próprio doente. Este modelo *in vitro* pode ser uma fonte renovável de tecido humano para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da ELA, além de poder identificar biomarcadores preditivos, monitorizar a progressão da doença e avaliar a resposta em ensaios clínicos.⁵⁸⁰ Comparado ao TES-controlo, o ALS-TES apresentou uma diferenciação epidérmica alterada, junção dermo-epidérmica anormal, infiltração de queratinócitos, desorganização do colagénio e inclusões citoplasmáticas de TDP-43.⁵⁸⁰ Notavelmente, estas alterações foram detectados em doentes pré-sintomáticos com a expansão de repetição G4C2 no gene *C9orf72*.⁵⁸⁰

Tabela 8 | Resumo dos principais biomarcadores em fluidos corporais.

Adaptado de Verber (2019).³⁸⁰

Biomarcador	Tipo de Amostra	Resultados Chave	Principais Características e Potenciais aplicações
Proteínas ligadas a mutações genéticas	LCR	<i>Poly (GP) C9orf72</i> presente pré-clinicamente; estável ao longo do tempo Níveis de proteína SOD1 estáveis ao longo do tempo	Potencial farmacodinâmico para ensaios clínicos
	Sangue	Nível de proteínas SOD1 na ELA familiar e esporádica Presença de repetições <i>poly (GP)</i> de doença presentes na doença <i>C9orf72</i> e TDP-43	SOD1 usado em ensaio clínico actual Ensaio clínico planeado especificamente para mutações em <i>C9orf72</i> Potencial como marcadores dos casos com mutações
Metilação do DNA	Sangue	Evidências contraditórias em diferentes tipos de células Metilação global parece ser promissora	Potencial, precisa de mais investigação
Neurodegeneração	LCR	Os níveis de NFL mantêm-se aumentados ao longo do tempo de forma estável; Níveis de NFH variável	Validado como marcadores de diagnóstico. Potencial para prognóstico e monitorização farmacodinâmica
	Sangue	O nível NFL pode aumentar com a duração da doença NFH níveis variáveis	Potencial uso de NFL como marcador de diagnóstico e prognóstico

Inflamação	LCR	Classe de citocinas, quimiocinas e proteínas imunológicas reguladas positiva e negativamente	Potencial para diagnóstico, prognóstico e progressão da doença; actualmente com resultados contraditórios
	Sangue	Células T reguladoras (<i>Treg</i>) alteradas Resultados contraditórios em estudos para citocinas, PCR, quitotriosidase	O uso potencial de <i>Tregs</i> como marcador prognóstico, actual estudo clínico de fase II Outros alvos precisam de ser investigados
	Urina	Urina p75ECD aumentada e aumenta ao longo do tempo	Potencial, precisa de mais investigação
miRNA	LCR	Diferenças nos painéis de <i>miRNAs</i> nos pacientes; resultados não concordantes	Potencial para suporte do diagnóstico precoce, prognóstico e biomarcador farmacodinâmico; precisa de mais investigação
	Sangue	Sangue = LCR	
Desinervação muscular	Sangue	Redução da creatinina sérica; alterações longitudinais na CK	Creatinina sérica como potencial marcador prognóstico A CK tem valor preditivo da progressão da doença

Metabolismo	LCR	Perfil lipídico distinto identificado através de 1H -MRS* e espectrometria de massa Inconsistências entre estudos	Potencial para uso diagnóstico e prognóstico Estudos longitudinais necessários
	Sangue	Marcadores de carboidratos e metabolismo lipídico, resultados contraditórios O glutamato apresenta resultados contraditórios em resposta ao tratamento Redução de albumina sérica	Marcadores de carboidratos e metabolismo lipídico associados com risco de doença; Glutamina e glutamato precisam de mais investigação Albumina sérica valor preditivo para a progressão da doença
	Urina	Estudos limitados de urina em F2-isoprostano (8-iso-PGF2 α), Colagénio tipo 4 e lucosilgalactosil hidroxilisina (glu-gal Hyl)	Potencial, precisa de mais investigação
Stress Oxidativo	LCR	Níveis elevados de 4HNE, 3-nitrotirosina Marcadores da via NRF-2, por exemplo, glutatona	Precisa de mais investigação
	Sangue	O ácido úrico apresentou resultados contraditórios, Ferritina, glutatona, 3-nitrotirosina, Aumento 4HNE	O ácido úrico mostra-se promissor como prognóstico na base de dados no PRO-ACT Necessário investigar outros candidatos
	Urina	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8OH2'dG) elevado e aumenta com a evolução	Potencial, precisa de mais investigação

Abordagem proteômica	LCR	Perfis com diferentes expressões Identificados, por exemplo, cistatina C, quitinases, MCP-1, Duvidoso na validação de marcadores individuais	Potencial como novos biomarcadores, mas estudos inconsistentes
-----------------------------	-----	--	--

Legenda da tabela: ELA-Esclerose Lateral Amiotrófica| LCR-Líquido Cefalorraquidiano|PCR-Proteína C Reactiva| MCP-1-|Proteína quimioatraente de monócitos-1| Células *Treg*-Células T reguladoras | NFL- Neurofilamentos de Cadeia Leves | NFH- Neurofilamentos de Cadeias Pesadas Fosforiladas | 4HNE-4-hidroxinonal | F2-Isoprostano- 8-iso-PGF2 α |8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8OH2'dG) | NRF-2-Factor nuclear eritroide 2 relacionado com factor 2| CK- Creatina Quinase | p75ECD-Receptor de neurotrofina p75 |*1H-MRS- Espectroscopia de ressonância magnética de prótons.

2.1.2.6. Marcadores Biométricos

Medidas Corporais Antropométricas

O estado nutricional, o consumo e o gasto energético, estão alterados na ELA.⁶⁶ Epidemiologicamente, um baixo peso pré-mórbido está associado a risco de ELA.⁵⁸¹⁻⁵⁸⁴ Na ELA, a prevalência de desnutrição varia entre 16 e 55%, o consumo calórico está abaixo das recomendações dietéticas, em pelo menos, 70% dos pacientes. Estes dados sugerem um balanço energético cronicamente negativo. A manutenção de um equilíbrio energético neutro previne a desnutrição e as complicações associadas à doença e pode melhorar a função, a qualidade de vida e a sobrevivência dos doentes,^{375,581,636,637} embora a ingestão insuficiente possa ser compensada com suporte nutricional, mas os requisitos energéticos não são claros.⁵⁸⁵

Desta forma o tratamento da doença implica a manutenção do peso, execução pronta da gastrostomia assim que indicado e a prescrição de suplementos nutricionais. Por esse motivo, nos ensaios clínicos a estratificação dos doentes em função do IMC ou da perda de peso é um assunto discutido.³⁸⁰

A tabela 9 resume os principais biomarcadores antropométricos.

Tabela 9 | Classificação de potenciais biomarcadores antropométricos na esclerose lateral amiotrófica (ELA).

Marcador	Observação	Utilidade como biomarcador na ELA						
		Específico da ELA	Reprodutível	Pré-diagnóstico	Estabilidade diurna	Independência	Mudança com a progressão da doença	Score Biomarcador
Índice de Massa Corporal (IMC)	Menor IMC é um indicador de mau prognóstico. Associação em forma de U; IMC menor está associado ao aumento do risco e à progressão mais rápida, enquanto o IMC na faixa de obesidade mórbida está associado à menor sobrevida. Grau de perda pré-mórbida do IMC preditor de risco de ELA	N	N	S	S	N	V	2.5
Peso Corporal	A perda de peso correlaciona-se com a progressão mais rápida da doença; perda de peso sugerida como um factor de risco para ELA	N	N	N	S	N	V	1.5
Massa Gorda	Massa gorda no diagnóstico não é um determinante de sobrevivência. O aumento da massa gorda está correlacionado com maior sobrevida	N	N	DI	S	N	S	2
Massa livre de gordura (MLG)	Massa livre de gordura no diagnóstico não é um determinante da sobrevivência. Perda de massa magra é associada a menor sobrevida	N	S	DI	S	N	S	3

Distribuição de Gordura	Redistribuição e aumento da deposição de gordura no músculo	N	DI	DI	S	N	DI	1
--------------------------------	---	----------	-----------	-----------	----------	----------	-----------	----------

Legenda da tabela: N| Não; S|Sim; V|Variável; DI|Dados Insuficientes; IMC|Índice de Massa Corporal; MLG| Massa livre de gordura. Adaptado de *Kirk et al. (2019)*.⁵⁸²

2.2. A INSUFICIÊNCIA RESPIRATÓRIA NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA

A insuficiência respiratória associada ao declínio da força muscular é a principal causa de morte em pacientes com ELA, que ocorre tipicamente entre 3 a 5 anos, após o início dos primeiros sintomas.⁵⁸⁶⁻⁵⁸⁸ As complicações respiratórias mais frequentes na ELA estão associadas à hipoventilação, redução da *clearance* brônquica e risco aumentado de infecção pulmonar.^{588,589}

O envolvimento respiratório ligeiro causa fadiga nas actividades da vida diária e perturbação do sono, com impacto negativo na qualidade de vida.^{589,590} Em situações mais avançadas a hipoxémia e a hipercápnia podem reduzir a função cognitiva^{589,591,592}, especialmente importante numa população com menor reserva cognitiva.⁵⁸⁹

Na ELA, são afectados os músculos inspiratórios e expiratórios, bem como os músculos das vias aéreas superiores.⁵⁹³ Para a inspiração activa, o diafragma é o músculo mais importante, embora outros músculos possam auxiliar, músculos acessórios. O seu enfraquecimento no decurso da doença é a principal causa de sintomas e complicações, mas estudos polissonográficos recentes indicam que a hipoventilação pode ocorrer em alguns doentes com função diafragmática preservada, tanto no sono REM quanto no não-REM, o que pode reflectir a disfunção do controlo central da respiração.^{587,594}

A tosse, um reflexo essencial para a protecção e *clearance* das vias aéreas, depende da oclusão eficaz da glote e da função eficiente dos músculos expiratórios. A disfunção muscular bulbar altera a primeira e, por esse motivo, a eficácia da tosse nem sempre se correlaciona com a fraqueza muscular expiratória.^{589,595} A fraqueza dos músculos faríngeos e laríngeos aumenta o risco de aspiração e infecção pulmonar, sobretudo na presença de tosse ineficaz.⁵⁸⁹

2.2.1. Manifestações Respiratórias

Características clínicas da Insuficiência Respiratória Precoce

Os clínicos normalmente confiam nos sintomas de insuficiência respiratória reportados pelo paciente, como a fadiga nos pequenos esforços, redução da tolerância ao exercício, dispneia durante um esforço físico, cefaleia matinal, sono interrompido, ortopnéia, sonolência diurna, apetite reduzido. Os testes da função respiratória são prescritos para avaliar o compromisso e determinar a necessidade de ventilação não

invasiva (NIV), que foi demonstrada melhorar a qualidade de vida e sobrevida em pacientes com ELA.¹¹⁴

As características clínicas da insuficiência respiratória precoce podem ser subtis e são frequentemente negligenciadas. Alguns pacientes apresentam mudanças no tom, no volume da voz e aumento da dificuldade em eliminar secreções devido à redução da tosse. Outros referem menor desempenho cognitivo.⁵⁹⁶ Pacientes com ELA apresentam também maior risco de desenvolver trombose venosa profunda e tromboembolismo pulmonar.^{588,597}

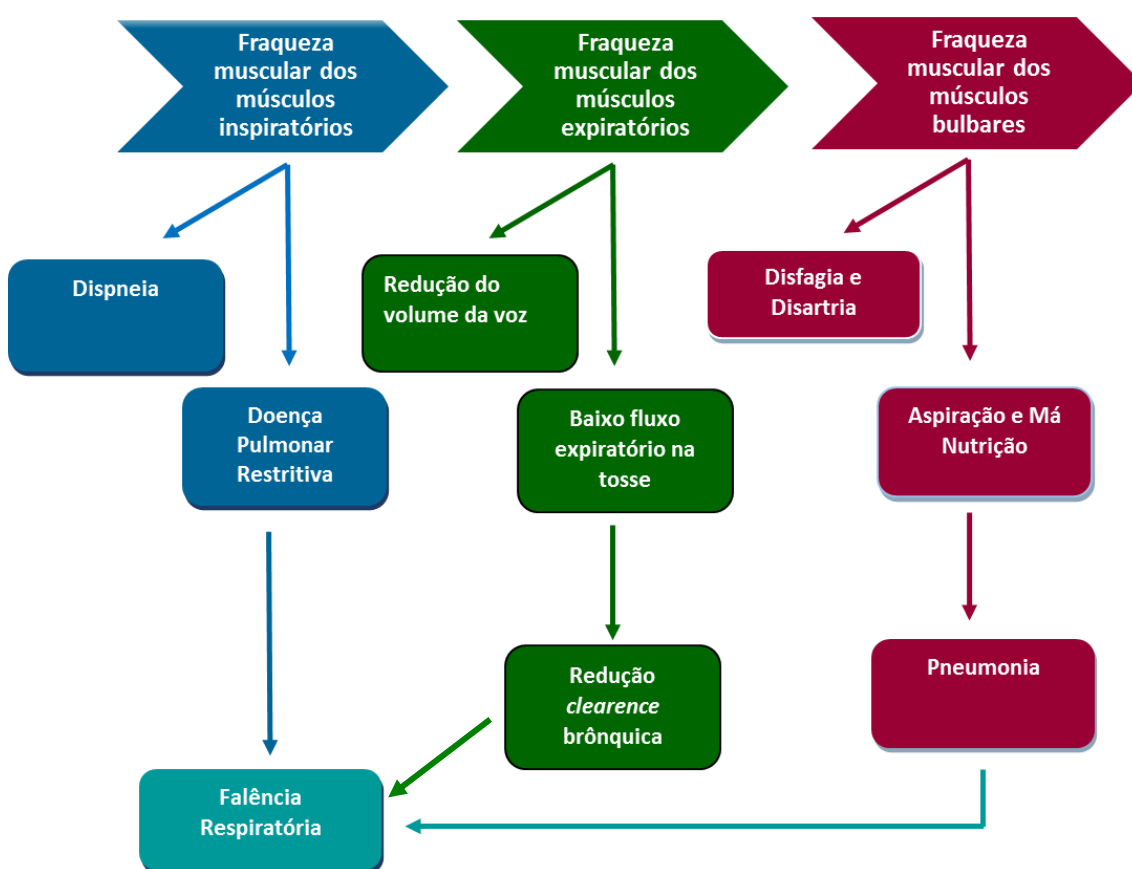


Figura 14| As principais anomalias respiratórias que se desenvolvem na ELA. Adaptado de Braun et al. (2018).¹

Como as complicações respiratórias são as causas mais comuns de morte em pacientes com ELA, a avaliação precoce e periódica da função respiratória é obrigatória (Figura 14).⁵⁹⁸

2.2.2. Testes de Função Pulmonar

Existem vários testes para avaliação da função pulmonar e podem classificar-se de acordo com o quanto são invasivos e se requerem a colaboração do paciente.

Testes como a capacidade vital forçada (FVC) a Capacidade Vital (CV), a pressão inspiratória máxima nasal durante um *sniff* (SNIP), as pressões máximas e o pico do fluxo de tosse (PCF), registam instantaneamente a função respiratória, mas podem estar alterados pela técnica inadequada, má colaboração e disfunção cognitiva. Medidas de CV, forçada e lenta, são amplamente utilizadas devido à disponibilidade e material publicado.^{411,681}

Estudos de registo do sono, oximetria percutânea e a monitorização transcutânea de dióxido de carbono são testes passivos e que monitorizam por um período mais longo. A estimulação do nervo frénico e, sobretudo, a determinação da pressão transdiafragmática de contracção (*Twpdi*) são testes mais invasivos e complexos, pois requerem especialistas experientes, mas são objectivos e não volitivos.

Capacidade Vital e Capacidade Vital Forçada

A capacidade vital (CV) foi definida por Hutchinson em 1846, como sendo o volume de ar que pode ser mobilizado entre uma inspiração e uma expiração máximas.⁵⁹⁹ O teste mais frequentemente utilizado para avaliar a função respiratória na ELA é a FVC,⁶⁰⁰ estando os seus valores correlacionados com a progressão da doença e a sobrevida.^{600,601} Um valor de FVC <50% do valor predito está associado a um mau prognóstico.⁶⁰⁰⁻⁶⁰²

Embora a FVC se correlacione com a sobrevida na ELA, um valor normal não exclui a presença de compromisso muscular respiratório. Embora as directrizes internacionais actuais recomendem a espirometria como o teste respiratório primário na ELA,^{1,115} este apresenta algumas limitações. A %FVC encontra-se nos limites da normalidade até haver um envolvimento considerável dos músculos respiratórios, como consequência da relação sigmóide das curvas de pressão-volume do pulmão. A FVC pode não ser confiável em pacientes com envolvimento bulbar devido à fraqueza orofacial.²⁴ Resultados dos testes de pressão inspiratória máxima (MIP) e pressão expiratória máxima (MEP) estão, também, relacionados com a sobrevida dos doentes. No entanto, esses testes também são difíceis de realizar, especialmente quando os músculos bulbares são afectados.⁶⁰³

Alguns dados indicam que os testes que quantificam directamente a força muscular, como a avaliação da pressão transdiafragmática, são melhores preditores da sobrevida livre de ventilação,^{1,604} no entanto, métodos invasivos não são apropriados para a monitorização dos doentes. Tem sido defendido que a avaliação da FVC (ou VC) na posição sentada e de decúbito pode ser mais sensível para detectar disfunção respiratória numa fase precoce,⁶⁰⁵ mas muitos doentes não toleram este procedimento, por parésia diafragmática ou pela presença de secreções.

Oximetria Nocturna e Polissonografia

A dessaturação nocturna do oxigénio é um marcador útil da disfunção respiratória.^{587,606-608} Uma dessaturação nocturna de oxigénio de 90% durante pelo menos um minuto cumulativo, é considerado um indicador precoce útil de insuficiência respiratória incipiente.⁶⁰⁷ Estudos do sono podem associar esta informação com os diferentes estadios do sono, bem como caracterizar episódios apneicos. Trabalhos prévios revelam que a hipoventilação é mais comum durante a fase REM do sono, nos casos de parésia diafragmática. O sono REM pode ser frequentemente encurtado ou ausente na ELA, conduzindo à interrupção do sono e fadiga durante o dia. Mas a hipoventilação pode ocorrer igualmente no sono não-REM em pacientes com função diafragmática preservada, sugerindo disfunção do centro respiratório.⁵⁹⁴ Questionários padronizados, como a Escala de Sonolência de *Epworth* e o Índice de Qualidade do Sono de *Pittsburgh*, podem ser usados para rastreio de pacientes com perturbações do sono e sonolência diurna excessiva.⁶⁰⁹

A Capnometria Transcutânea (*PtcCO₂*)

Os níveis de dióxido de carbono podem ser medidos de forma não-invasiva no sangue, pelo uso de um dispositivo portátil que pode ser usado numa clínica ou ambiente doméstico. É uma abordagem recente para avaliar a função respiratória na ELA e em outras doenças neuromusculares.^{589,610} Os valores registados de *PtcCO₂* apresentam uma forte correlação com as medidas arteriais. Um valor superior a 49 mmHg durante $\geq 10\%$ do tempo total de registo indica insuficiência respiratória.^{589,610} A capnografia transcutânea tem sido fortemente recomendada para detecção de hipoventilação nocturna em pacientes com ELA.^{589,610,611} Em pacientes com ventilação não-invasiva, a *PtcCO₂* pode ser útil para monitorizar este tratamento, particularmente para diferenciar entre hipoventilação e hipoxémia associada a outras causas.^{589,611}

Gasometria Arterial

Embora alterações na troca gasosa nocturna sejam relativamente comuns na ELA, a hipóxia e a hipercapnia diurna são incomuns e ocorrem tardiamente no decurso da doença.^{1,610} Portanto, não se recomenda efectuar a gasometria arterial rotineiramente em pacientes com ELA. Esta deve ser considerada, somente, em casos seleccionados, como em alguns doentes com sintomas respiratórios, marcados distúrbios do sono ou hipersonolência.^{1,610}

Ventilação Voluntária Máxima (VVM)

A ventilação voluntária máxima (VVM), uma medida da resistência muscular respiratória, exige que os pacientes respirem o mais profundamente e rapidamente possível por 12 segundos.⁶¹² Embora se tenha mostrado alterar-se durante a progressão da doença ELA,⁶⁰² não é sensível no início da doença,^{612,613} sendo difícil de aplicar na monitorização, pois alguns pacientes têm dificuldade em realizar a manobra por ser muito exigente.⁶⁰² Na prática clínica este teste raramente é realizado.

Pressão Inspiratória Máxima Nasal Durante um *Sniff* (SNIP)

A pressão inspiratória nasal durante uma manobra de *sniff* (*Sniff nasal Inspiratory pressure*—SNIP) tem sido utilizada como uma alternativa para avaliar a força muscular inspiratória, uma vez que é de fácil execução e não-invasiva.

Estudos mais recentes mostraram que o SNIP máximo se correlaciona bem com testes invasivos e não-volitivos,⁶⁰³ tal como a medição da pressão transdiafragmática.⁶¹⁴ O SNIP tem a vantagem de poder ser usado em pacientes com disfunção bulbar, pois não requer força de oclusão labial em torno de um bocal. Um SNIP <40 cm H₂O correlaciona-se com a hipóxia nocturna e com um aumento do risco de morte nos 6 meses seguintes.⁶⁰³ No entanto, alguns pacientes apresentam dificuldade em colaborar com o teste devido a certa dificuldade na coordenação e/ou comprometimento cognitivo.^{596,615}

Resposta Motora Diafragmática

Técnicas mais invasivas têm sido utilizadas para a monitorização da progressão do declínio respiratório na ELA. A amplitude da resposta motora do nervo frénico, por estimulação eléctrica superficial, tem valor preditivo de hipoventilação e da sobrevida em doentes com apresentação medular ou bulbar.^{25,616,617} A amplitude diafragmática correlaciona-se, igualmente, com outros testes respiratórios convencionais^{616,617} e

com os sintomas,^{612,618} pelo que esta técnica pode ser usada em doentes que não possam cooperar com outros testes de função pulmonar, mais padronizados.^{616,617}

A ultrassonografia é um método não-invasivo que permite a avaliação directa e dinâmica da espessura e do movimento do diafragma⁶¹² e tem correlação com o FVC e com a amplitude da resposta motora por estimulação do nervo frénico.^{612,619}

2.3. POTENCIAIS BIOMARCADORES MOLECULARES DE INSUFICIÊNCIA RESPIRATÓRIA NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA

Na ELA apesar de vários testes respiratórios serem sensíveis na detecção de disfunção ventilatória e indicarem o prognóstico,^{24,25,600} nenhum biomarcador molecular de insuficiência respiratória foi identificado. Esse biomarcador seria particularmente útil na prática clínica, pois os testes respiratórios clássicos têm limitações. Por este motivo fomos estudar os potenciais biomarcadores moleculares de insuficiência respiratória na ELA.

2.3.1. Club Cell Secretory Protein (CC-16)

A *Club Cell Secretory protein* (anteriormente denominada de células de Clara -CC-16, CC-10, CCSP ou Uteroglobina) é uma proteína sintetizada predominantemente nos pulmões e quantificável no soro. É um membro da família da secretoglobina, secretada por um grupo de células localizadas no epitélio traqueobrônquico, principalmente nos bronquíolos terminais,⁶²⁰⁻⁶²² as CC-16 são células não mucosas.⁶²³ Esta proteína, de baixo peso molecular (15,8-kDa) consiste em 70 a 77 subunidades de aminoácidos ligadas covalentemente,^{624,625} passa da superfície das vias aéreas, através do epitélio para o sangue, provavelmente por difusão passiva.⁶²⁰⁻⁶²²

Vários estudos demonstraram que a CC-16 é uma proteína multifuncional, com propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias, incluindo inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e de células imunes.⁶²⁴⁻⁶²⁷ A CC-16 inibe a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos, sendo capaz de controlar a proliferação e migração de fibroblastos. Apresenta também actividades anti-alérgicas, anti-quimiotáticas, estimuladoras do crescimento embrionário e anti-tumorais.⁶²⁸ Além disso, a CC-16 tem a capacidade de se ligar e pode, potencialmente, sequestrar ligandos hidrofóbicos, como os retinóis, progesterona, fosfolipídios e prostaglandinas.^{624,629,630}

A proteína CC-16 tem sido considerada um biomarcador sensível de integridade epitelial das vias aéreas, os seus níveis aumentam em infecções pulmonares agudas, e na presença de acelerado declínio da função pulmonar na doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC).^{631,632} Mas pode ter um valor reduzido em doenças respiratórias crónicas, por redução das células de clara no pulmão.⁶³²

2.3.2. Interleucina 6 (IL-6)

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina multifuncional envolvida na regulação da resposta imune, inflamação, metabolismo e hematopoiese, produzida por células imunes, sanguíneas, endoteliais e por miócitos⁶³³ e que pode atravessar a barreira hematoencefálica.⁶³⁴ Tem sido estudada nas doenças neurodegenerativas.^{531,633}

A IL-6 derivada de músculo, conhecida como “mioquina” ou “factor de exercício”, tem acção anti-inflamatória (redução da produção de TNF- α , estimulação do agonista do receptor da citocina IL-1), induz a lipólise e aumenta os níveis de glicogénio muscular.^{635,636} O efeito anti-inflamatório do exercício pela produção de miocina IL-6 tem benefícios importantes não apenas para a homeostase muscular, mas também para a saúde geral. No entanto, o papel da IL-6 como indutor primário ou secundário na resposta celular devido à interacção com outras citocinas ainda não está claro. Na verdade, a IL-6 pode actuar como um mediador anti-inflamatório ou pró-inflamatório.^{531,637-640}

Vários estudos prévios reportaram aumento nos níveis séricos e no LCR de IL-6 em doentes com ELA, provavelmente relacionado com o papel dos processos inflamatórios na degeneração do neurónio motor.^{641,461,462,481,642} Estudos de biópsias de pele em pacientes com ELA demonstraram maior imunoreactividade à IL-6 quando comparados com controlos de indivíduos saudáveis. A imunoreactividade da IL-6 foi marcadamente positiva na epiderme e nos vasos sanguíneos dérmicos, em particular em pacientes com maior tempo de doença, mostrando correlação com os níveis séricos.⁵²⁸ No entanto, níveis anormais não foram consistentemente encontrados, alguns autores reportaram valores semelhantes aos controlos.⁶⁴³ Num estudo que envolveu doentes com ELA, observados durante um período de 4 anos, os níveis plasmáticos de IL-6 estavam fortemente associados aos níveis de proteína C-reactiva.⁴⁹⁶ Alguns autores reportaram níveis de IL-6 níveis mais elevados de IL-6 no início da doença,⁴⁹⁶ o que justifica a ausência de correlação linear com o valor da escala funcional.⁴⁶² Possivelmente a hipóxia é um factor associado à maior libertação

de IL-6 na ELA⁴⁸¹ e em outras doenças,⁴⁸¹ como ocorre na apneia obstrutiva do sono.⁶⁴⁴ Os níveis séricos e no LCR de IL-6 correlacionaram-se com a PaO_2 na ELA.⁴⁸¹ Tal facto, pode ser explicado pela libertação de citocinas pró-inflamatórias pela activação da microglia induzida por hipóxia.⁶⁴⁵

2.3.3. Creatinina (Cr)

A creatinina plasmática é um produto de decomposição do fosfato de creatina nos músculos e está relacionada com a massa muscular.^{541,646,647} A creatinina (MW 113 Da) é o anidrido cíclico da creatina, que é produzido como o produto final da decomposição da fosfocreatina.^{648,649}

A creatina é sintetizada nos rins, fígado e pâncreas, por duas reacções enzimáticas. Na primeira, a transamidação da arginina para a glicina forma o ácido guanidinoacético; a segunda, a metilação do ácido guanidinoacético (glicociamida), ocorre com a S-adenosilmetilionina sendo dadora do grupo metilo. A creatina, seguidamente, é transportada para o sangue e outros órgãos, como o cérebro, rim e músculo, onde é fosforilada a fosfocreatina, composto de elevada energia. A interconversão entre a fosfocreatina e a creatina é uma característica particular do processo metabólico de contracção muscular; parte da creatina livre no músculo transforma-se espontaneamente em creatinina. Entre 1-2% da creatina muscular são transformados por dia em creatinina. Devido à quantidade de creatinina endógena produzida ser proporcional à massa muscular, a produção varia com sexo e idade. Os homens não obesos excretam cerca de 1,5 mg/dia, e as mulheres 1,2 g/dia. A excreção diária de creatinina pode ser 10% a 30% maior como resultado da ingestão de creatina e creatinina presente na carne. A excreção renal em qualquer pessoa, na ausência de doença renal, é relativamente constante e correlaciona-se com a produção endógena. A maior parte das variações inter-individuais da excreção da creatinina, em pessoas saudáveis, é atribuída essencialmente à idade, sexo e massa corporal magra.^{648,649} A quantificação da creatina plasmática e da respectiva depuração renal são utilizadas como indicadores da função renal.^{648,649}

A creatinina é um forte marcador da massa muscular, estando reduzida na ELA pela perda de massa muscular.^{504,542,650,651} A sua concentração plasmática foi descrita na ELA como um factor prognóstico independente para o declínio funcional^{500,541,652} e morte, em doentes bulbares e medulares.^{506,542,653,654} Num estudo retrospectivo

recente foram consideradas 3 bases de dados, num total de 1241 pacientes, os investigadores encontraram menos variabilidade inter-individual no valor do declínio da creatinina plasmática, do que para a escala funcional ALSFRS-R. Para mais, identificaram forte correlação longitudinal entre a creatinina plasmática, o *score* funcional ALSFRS-R e a força muscular. A menor variabilidade, sendo um marcador de baixo custo e de fácil acesso, promove a sua utilização em ensaios clínicos.³³

Estudos que correlacionem a creatinina e a função respiratória na ELA são escassos, Chiò *et al.*, reportam uma correlação entre os níveis de creatinina e o *score* da avaliação clínica respiratória pela escala funcional ALSFRS-R e com o valor de FVC, mas sem estabelecer um valor de prognóstico.⁵⁴²

2.3.4. Fibrinogénio γ' (*Gamma Prime Fibrinogen- γ'*)

O fibrinogénio é a terceira proteína plasmática mais abundante no plasma. É uma glicoproteína plasmática de grande dimensão molecular, complexa e multifuncional, sintetizada pelos hepatócitos.³⁶ Tem um papel essencial para a hemostase cicatrização de feridas, fibrinólise, inflamação, angiogénese, interacções celulares e da matriz.^{36,655-657}

Fibrinogénio no plasma é uma mistura heterogénea de isoformas com diferentes proporções relativas. As variantes de fibrinogénio são o resultado do *splicing* alternativo do RNAm da cadeia γ . O processamento de RNAm e as modificações pós-traducionais dão origem a várias isoformas diferentes de fibrinogénio com características muito variadas.

A isoforma γ' tem uma substituição dos últimos 4 resíduos de aminoácidos do terminal carboxilo (AGDV) da cadeia γ' A prevalente por uma sequência de resíduos de 20 aminoácidos diferentes (VRPEHPAETEYDSLYPEDDL), que inclui uma elevada proporção de resíduos carregados negativamente e duas tirosinas sulfatadas. Esta variante representa 8-15% de todo o fibrinogénio plasmático, principalmente na forma do heterodímero $\gamma A\gamma'$, enquanto o homodímero $\gamma'\gamma'$ é responsável por menos de 1% do fibrinogénio plasmático total.^{37,38}

A cadeia γ do fibrinogénio tem 2 isoformas, agrupadas no cromossoma 4q31: a isoforma gama A (γA ou simplesmente γ) e a isoforma gama-prime (γ' ou γB). Por conseguinte, ao nível da cadeia γ , a molécula de fibrinogénio pode ser um homodímero ($\gamma A/\gamma A$) que constitui aproximadamente 84% da concentração total de fibrinogénio no plasma, um heterodímero ($\gamma A/\gamma'$) que está presente em

aproximadamente 15% ou um homodímero (γ'/γ') que constitui o 1% restante da concentração de fibrinogénio.^{37,41,658,659}

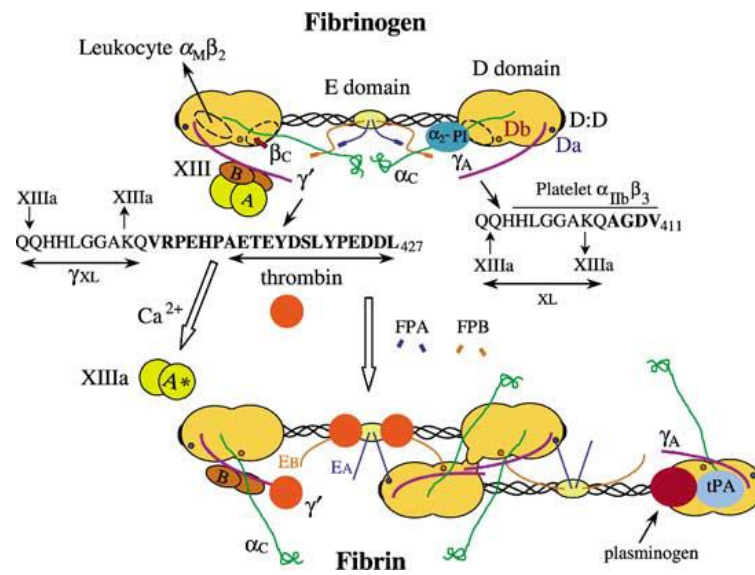
O fibrinogénio desempenha um papel proeminente no processo inflamatório.^{36,660} O aumento do fibrinogénio no sangue é considerado um indicador pró-inflamatório e um marcador de alto risco para o desenvolvimento de patologias.⁶⁶¹

Ao formar coágulos sanguíneos de fibrina que são altamente resistentes à fibrinólise, foi hipotetizado que o fibrinogénio γ' pode promover a trombose.^{41,660,662} Estudos transversais e retrospectivos sugerem que o nível de fibrinogénio γ' está positivamente associado a eventos aterotrombóticos,^{36,662,663} embora os mecanismos subjacentes sejam motivo de debate.^{664,665} Na verdade, o fibrinogénio γ' , tem sido associado a um maior risco de tromboembolismo venoso, acidente vascular cerebral isquémico, doença arterial coronária e ao enfarte do miocárdio.^{38,661}

A associação entre fibrinogénio γ' e trombose arterial pode ser devida, pelo menos em parte, à associação entre fibrinogénio γ' e a inflamação. A inflamação é agora um factor de risco bem estabelecido para trombose arterial,^{660,666} e o fibrinogénio γ' mostrou forte associação com a inflamação em vários estudos publicados. Num estudo de caso-controlo,^{660,667} os níveis de fibrinogénio γ' aumentaram durante a fase aguda do acidente vascular cerebral (quando a proteína C-reativa estava elevada) com redução durante a convalescença (quando os níveis de PCR também diminuíram). Além disso, a proporção de fibrinogénio γ' /fibrinogénio total também aumentou durante a fase aguda, ao contrário do observado na convalescença. Estudos subsequentes confirmaram que o fibrinogénio γ' tem forte associação com os níveis da proteína C-reativa e pode representar um novo marcador para a inflamação.^{41,660,661,668}

O fibrinogénio tem sido explorado como biomarcador de doença respiratória crónica, como a DPOC, nomeadamente quanto à severidade da doença, sua progressão e mortalidade. A trombose venosa profunda é uma complicação comum na ELA.^{39,40} Apesar de sua importância, na inflamação e na hemostasia, nenhum estudo até hoje foi efectuado sobre o papel do fibrinogénio γ' na ELA.

a)



b)

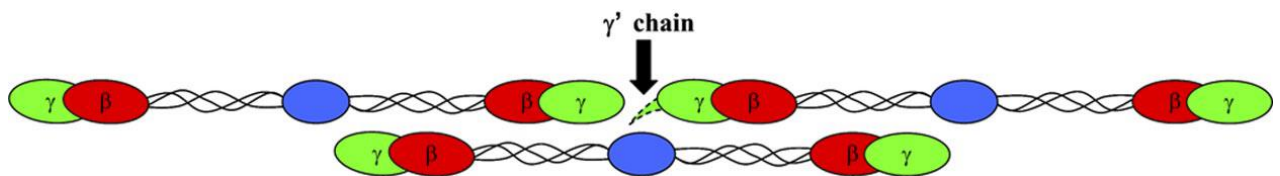


Figura 15| Moléculas de fibrinogênio.

Adaptado de Mosesson *et al.* (2003), de Willige *et al.* (2009).^{669,670}

a) Diagrama da estrutura do fibrinogênio e da fibrina, seus principais locais funcionais e suas interações com outras proteínas. Estão representados locais de ligação para proteínas, enzimas, receptores e outras moléculas que participam das funções da fibrina (fibrinogênio).

b) Moléculas de fibrinogênio com localização da cadeia γ' .

A extensão de aminoácidos da cadeia γ' está localizada no terminal carboxi (seta preta) da cadeia γ na região D da molécula. Quando o fibrinogênio é convertido em fibrina pela clivagem da trombina de fibrinopéptidos na região E, a fibrina polimeriza através de interações D-E-D, com a extensão γ' no interface D-D. A estrutura da cadeia γ' é desconhecida, mas um extra de 16 resíduos de aminoácidos pode estender-se até 30 a 40 Å ou mais, dependendo da dobragem. Considerando este comprimento, a extensão da γ' poderia estender-se até a região E de uma molécula vizinha no complexo D-E-D.⁶⁷⁰

2.4. O ERITRÓCITO: ESTRUTURA E BIOLOGIA

O sangue pode ser dividido basicamente em duas partes, o plasma e as células sanguíneas. O plasma constitui cerca de 55% do volume total do sangue e compreende aproximadamente 92% de água. As células sanguíneas podem ser divididas em três tipos principais: glóbulos brancos, plaquetas e glóbulos vermelhos (eritrócitos), sendo este último, o tipo de célula mais abundante no sangue.⁶⁵⁹ Os eritrócitos são células anucleadas únicas com um citoplasma constituído por 95% de hemoglobina, por isso são sistemas de transporte altamente especializados de O₂.^{659,671,672} Os eritrócitos geralmente maduros têm aproximadamente 8 µm de diâmetro, uma espessura de 2 µm, uma área de 132 µm² e um volume de 90 fL. Têm uma vida útil de aproximadamente 120 dias, *in vivo*, sendo selectivamente removidos da circulação via fagocitose.^{659,673} Para transportar hemoglobina através de pequenos vasos, esta células bicôncavas devem possuir uma membrana altamente deformável, porém robusta.^{659,674,675} As suas membranas têm sido extensamente estudadas,^{659,675} em esquema esta compreende uma camada de bicamada fosfolipídica assimétrica, como mostrado na Figura 16. As principais proteínas da membrana são: espectrina, anquirina, banda 3, glicoforina C, banda 4.1 e actina, em ordem decrescente de peso molecular,^{659,676,677} no entanto, outras moléculas também estão presentes, mas em concentrações mais baixas. A membrana plasmática, juntamente com seu suporte citoesquelético é responsável pela manutenção da forma bicôncava dos eritrócitos, mas permitindo marcada deformabilidade.^{659,678} Além disso, a rugosidade da membrana celular é um indicador muito interessante da capacidade funcional da célula.^{659,679} Durante a sua vida útil, o eritrócito sofre mudanças físicas e químicas progressivas, alterando sua macroestrutura,^{659,680} como a diminuição do volume celular. Isso pode ser causado pela perda de potássio e pela perda de fragmentos na membrana pela microvesiculação, resultando num aumento da densidade celular.⁶⁵⁹ Alterações nas proteínas esqueléticas da membrana, sua forma, suas propriedades reológicas e mecânicas, podem resultar de várias doenças e disfunções, causando perturbação da microcirculação.^{659,681,780}

O eritrócito tem um estrito controlo do teor de sódio e água, face a perturbações osmóticas extracelulares e intracelulares, tal permite que a célula mantenha estável a concentração de hemoglobina celular, um processo crítico para a função e sobrevivência normal dos glóbulos vermelhos. Os distúrbios primários que perturbam

a homeostase do volume comprometem o eritrócito e podem levar à sua destruição prematura.⁶⁸²

O envolvimento potencial dos eritrócitos na hemostase e inflamação está a despertar crescente interesse, pois a sua membrana tem receptores de ligação a mediadores inflamatórios. Desta forma, os eritrócitos estão alterados no processo inflamatório, incluindo sua deformabilidade, propriedades reológicas e velocidade de sedimentação.³⁴

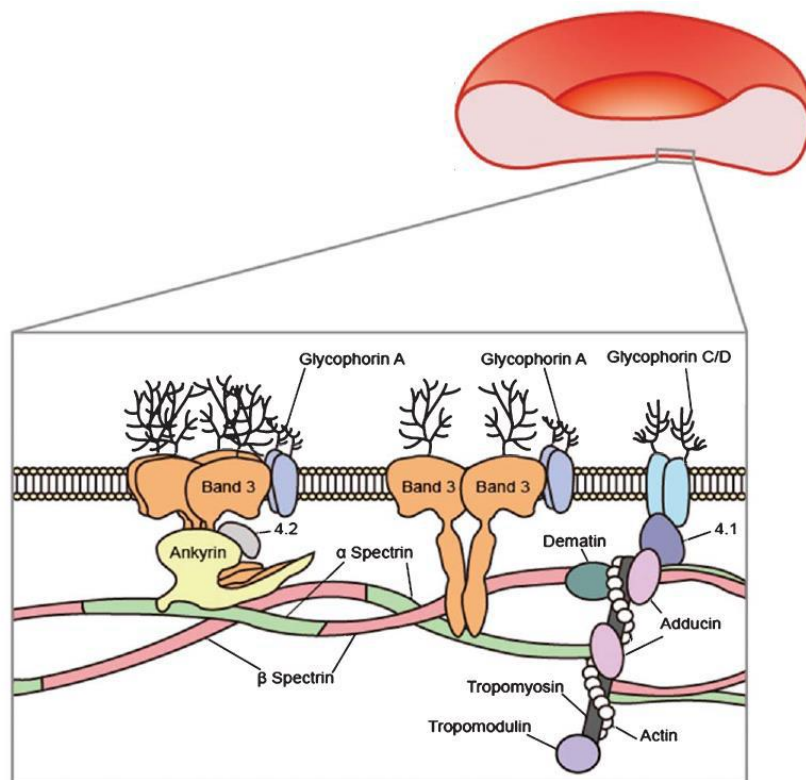


Figura 16| Composição da membrana eritrocitária: bicamada lipídica, proteínas transmembranares e rede filamentososa de proteínas, formando um esqueleto de membrana.

As proteínas da membrana são orientadas assimetricamente e com três funções principais: proteínas estruturais, catalíticas e receptoras.⁶⁸³

2.4.1 Efeitos Reológicos dos Eritrócitos

A reologia sanguínea é um campo complexo e determinado principalmente por variáveis como o hematócrito, a viscosidade sanguínea, a agregação eritrocitária, elasticidade e a deformabilidade.^{659,684} De modo geral, uma mudança significativa na microreologia dos eritrócitos poderia ter relevância fisiológica nas alterações do fluxo

sanguíneo, afectando a capacidade dos eritrócitos de atravessar os capilares, modulando a distribuição de sangue nos territórios vasculares e, dessa forma prejudicando a oxigenação tecidual (microcirculação).^{659,685-687}

Nos últimos anos, numerosos avanços no cenário da hemorreologia clínica têm sido reportados,⁶⁸⁸⁻⁶⁹⁰ contribuindo para a compreensão mais profunda do papel do fluxo sanguíneo nos tecidos.^{659,691,789} A agregação patológica dos eritrócitos pode estimular por si só processos anormais e intensificar algumas anormalidades da coagulação sanguínea. A agregação eritrocitária está aumentada em doentes com doença coronária e em pacientes com nefropatia diabética. Em condições inflamatórias, observa-se uma série de mudanças nas propriedades biofísicas dos eritrócitos, incluindo hematócrito, agregação, velocidade de sedimentação e a deformabilidade.³⁴

2.5. OBJECTIVOS DA TESE

Os principais objectivos desta tese são a identificação de biomarcadores moleculares que possam ser relevantes como factores de prognóstico do declínio funcional da capacidade respiratória na ELA, incluindo o fibrinogénio γ' , assim como investigar as alterações das propriedades dos eritrócitos na perspectiva do seu papel na hipóxia tecidual.

Para atingir estes objectivos propusemos os seguintes pontos:

- ✓ Estudar um conjunto de biomarcadores respiratórios (CC-16, IL-6, creatinina e fibrinogénio γ' plasmático), nomeadamente quanto ao valor de prognóstico para o declínio respiratório.
- ✓ Identificar e avaliar as alterações das propriedades hemorreológicas, morfológicas e biofísicas dos eritrócitos.

Para atingir tais objectivos, várias técnicas e metodologias foram utilizadas, tais como tecnologia Multiplex, ensaios imunoenzimáticos (ELISA), microscopia de força atómica (AFM), estudos hemorreológicos (viscosidade do sangue total, deformabilidade eritrocitária e análise de agregação de eritrócitos), bem como a avaliação clínica por metodologias já implementadas na avaliação do doente com ELA.

O trabalho realizado em cada um dos tópicos indicados acima é discutido nos capítulos seguintes.



MATERIAIS E MÉTODOS

“The most beautiful thing we can experience is the mysterious. It is the source of all true art and science.”

Albert Einstein

3.1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DOS MÉTODOS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS

3.1.1. Microscopia de Força Atômica

A microscopia de força atômica (AFM) foi criada em 1986,⁶⁹² sendo um marco na história da nanotecnologia. Nas últimas 3 décadas, o AFM tem sido aplicado numa variedade de áreas de investigação, como física, química, engenharia, biologia e ciências médicas.^{693,694} A técnica de imagem em nanoescala permite medir as propriedades das moléculas e estudar as propriedades dinâmicas em sistemas biológicos.^{695,696}

A AFM é uma poderosa técnica de imagem multifuncional que permite a visualização e manipulação de amostras biológicas, desde moléculas únicas até células vivas.⁶⁹³ Como tal, pode ser realizada a observação da amostra em condições fisiológicas. Numa imagem produzida por AFM é possível analisar as características topográficas da superfície, como a rugosidade da membrana dos eritrócitos à escala nanométrica. O AFM também pode ser usado para observar mudanças nas propriedades mecânicas.

A AFM é uma técnica de varrimento de superfície das amostras que usa um *cantilever* com uma ponta. É utilizada para analisar a topografia das amostras pela análise de imagens ou para medir ou aplicar forças de interacção entre a ponta do *cantilever* e a amostra.^{45,697,655} O *cantilever* é um pequeno braço flexível controlado na direção z por um cristal piezoelétrico. O *cantilever* funciona como uma mola para medir a força entre a ponta e a superfície da amostra.⁶⁵⁵ A ponta afiada é colocada em contacto com a amostra e move-se pela superfície. O instrumento mede a deflexão do *cantilever* durante o varrimento e, a partir dessa informação sobre o movimento da ponta, é construída uma imagem pseudo-tridimensional da amostra.^{696,698} A deflexão do *cantilever* é detectada por um *laser* e traduzida em informações de topografia 3D da superfície digitalizada por meio de um *loop de feedback* que controla a altura do *cantilever* no espaço. Uma imagem em AFM pode ser obtida em modos diferentes. A ponta pode estar continuamente em contacto com a superfície da amostra (modo de contacto), ou o *cantilever* pode oscilar e as variações na sua frequência de ressonância são usadas para originar imagens (contacto intermitente ou modo *tapping*). Neste modo, o *cantilever* move-se rapidamente com uma amplitude de

oscilação definida havendo forças repulsivas e atractivas entre a ponta do *cantilever* e a superfície.⁶⁵⁵ As deflexões do *cantilever* captadas pelas alterações de posição do laser no quadrante do fotodíodo, podem ser traduzidas em força aplicada através da aplicação da Lei de *Hooke*.⁶⁹⁹

$$F = -K\Delta x$$

Isso significa que a força (F) necessária a efectuar no cantilever é proporcional à sua deflexão (Δx) e ao valor da sua constante de mola (K).⁶⁹⁸ Assim, uma deflexão do *cantilever* versus deslocamento do *scanner* pode ser convertida numa curva força-distância.⁷⁰⁰ Quando a ponta entra em contacto com a amostra num determinado ponto, o *cantilever* move-se verticalmente no eixo do Z e a deflexão do *cantilever* fornece informações sobre as propriedades mecânicas da superfície da amostra ou sobre as interacções ponta-amostra (modo de espectroscopia de força).

Os principais modos principais de operação de AFM: Contacto, Contacto intermitente (oscilação) e força são usados para imagens de amostras biológicas (Figura 17).

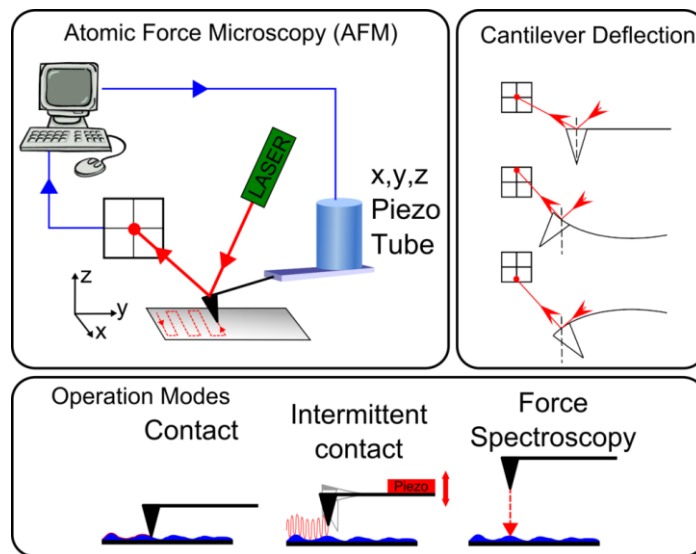


Figura 17 | Componentes principais de um microscópio de força atômica e respectivo modo de operação.

Adaptado de Carvalho *et al.* (2010)⁶⁹⁹

Aplicações de Microscopia de Força Atómica

Imagens de Células

A microscopia de força atómica tem sido aplicada para caracterizar, à escala nanométrica, superfícies de amostras e mapear a distribuição espacial de suas propriedades físico-químicas. O AFM tem a capacidade de visualizar características topográficas e relacioná-las com a densidade de carga superficial e características eléctricas dos biomateriais. Os modos de contacto e oscilação são mais comumente usados para imagens de proteínas de membrana reconstituídas e membranas nativas.⁷⁰¹ A técnica de AFM envolve um pequeno sensor de varrimento sobre a superfície da célula. A AFM é tipicamente uma técnica de imagem na qual a superfície de uma amostra é digitalizada, linha por linha, pelo movimento de uma ponta do *cantilever* flexível. A repulsão entre a amostra e a ponta do *cantilever*, traduzida pela deflexão *cantilever* permite a associação de um valor de altura a cada posição no plano x, y, permitindo a reconstituição de uma imagem pseudo-tridimensional de alta resolução da superfície da amostra.⁷⁰² O AFM tem a capacidade de visualizar em ar ou em meios fisiológicos, superfícies não condutivas ou condutivas, além do limite de difracção de luz, atingindo resolução molecular e atómica.⁶⁵⁵ Operando em modo de contacto, a força aplicada pela ponta é constantemente ajustada manualmente para a imagem da amostra num estado não perturbado. No modo de oscilação (contacto intermitente), o *cantilever* é rapidamente oscilado na direcção vertical enquanto efectua o varrimento da amostra. Idealmente, a ponta do AFM somente toca na amostra no seu movimento descendente e não está em contacto constante com a amostra como no modo de contacto. O modo "*tapping*" tem a vantagem de forças laterais e atrito serem virtualmente eliminados. Assim, o modo de oscilação é particularmente conveniente para imagens de AFM de biomoléculas frágeis e fracamente adsorvidas. No entanto, apesar dessa vantagem considerável, o modo de contacto em AFM continua a ser o modo de operação de escolha para obter alta resolução em superfícies de proteínas de membrana nativas e reconstituídas.^{658,701} Imagens de AFM de células originam informações estruturais relevantes, permitindo a identificação de componentes funcionais nas células e dando informações sobre a heterogeneidade da superfície celular em termos de composição e distribuição de proteínas.^{658,696,698}

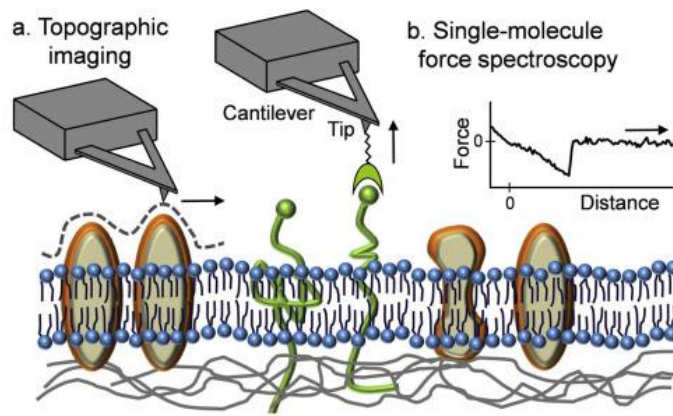


Figura 18 | Modos diferentes no AFM para diferentes aplicações.

(a) Imagem topográfica incluindo o modo de contacto alternado (*tapping*) e modo de contacto que permite a geração de imagens da superfície da célula. (b) A espectroscopia de força é usada para medir as forças de interacção entre a ponta do *cantilever* e a superfície produzindo uma curva força-distância.⁷⁰³

Espectroscopia de Força Baseada em Microscopia de Força Atômica

A espectroscopia de força baseada em AFM permite a medição das forças de interacção inter e intramolecular necessárias para separar a ponta da amostra, com resolução de piconewton (pN).^{655,700,702} A força de interacção depende da natureza das amostras, das pontas das sondas e da distância entre elas. Mede a força de interacção entre uma ponta afiada do *cantilever* e uma superfície.

Diferentes tipos de forças podem ser estudadas usando espectroscopia de força baseada em AFM, tanto atractiva quanto repulsiva.⁷⁰⁴ A espectroscopia de força baseada em AFM pode ser usada em diversas aplicações. Os principais modos de aplicação que foram aplicados neste estudo foram interacção molecular, adesão e indentação.⁶⁵⁸ A espectroscopia de força baseada em AFM tem sido usada por parceiros de investigação da Unidade de Biomembranas e Nanomedicina do Instituto de Medicina Molecular, para medir a força de ligação entre o fibrinogénio e os receptores celulares e na identificação do receptor de fibrinogénio nos eritrócitos.⁶⁹⁹

(i) Elasticidade Eritrocitária de Pacientes com ELA e Controlos

Estudos de Nanoindentação em AFM

Nanoindentação é usada para determinar as propriedades elásticas, como o módulo de elasticidade, quando a ponta do *cantilever* se afasta da célula.^{45,46} A elasticidade das células pode ser medida por nanoindentação com os *cantilevers* mais comuns da AFM, através da teoria Hertziana.⁷⁰⁰ Esta teoria do contacto elástico é a abordagem

mais amplamente utilizada para estimar as propriedades elásticas das células a partir de curvas de indentação de força, usando a profundidade de indentação para avaliar a elasticidade em termos do módulo elástico de *Young*. Especificamente, esse método permite caracterizar a elasticidade das estruturas biológicas, comparando diferentes tipos de células ou mesmo organelos.

A detecção de rigidez baseada em AFM é altamente dependente do uso apropriado de modelos teóricos. Condições experimentais dizem respeito à forma dos recortes ou à espessura da amostra.⁷⁰⁰

Assim a utilização do AFM permite a determinação de propriedades moleculares e mecânicas específicas:^{700,705}

(ii) Interações Eritrócito-Eritrócito:

As interações entre biomoléculas são mediadas por um conjunto complexo de forças intermoleculares e intersuperficiais, que formam um número de ligações específicas não covalentes. Resumidamente, esta metodologia envolve:

- a) a ligação covalente do eritrócito ao *cantilever* do AFM;
- b) a adsorção de células sanguíneas numa lâmina de vidro tratada com poli-L-lisina (em tampão);
- c) o *tapping* com o *cantilever* tratado com eritrócitos até a ocorrência de um evento de ligação;
- d) o puxar do *cantilever*, medindo a energia (trabalho) necessária para separar dois eritrócitos.

(iii) Imagens de AFM para Analisar a Morfologia dos Eritrócitos e Rugosidade da Superfície:

As experiências de AFM foram efectuadas num microscópio de força atómica *NanoWizard II* (*JPK Instruments*, Alemanha) acoplado a um microscópio óptico/de fluorescência invertido (*Zeiss*, Alemanha). As imagens AFM foram analisadas usando o *software* específico de processamento de dados AFM. As diferenças na rigidez celular foram avaliadas por espectroscopia de força baseada em AFM. A avaliação das alterações morfológicas das células incluiu a medição de parâmetros como o diâmetro, altura, área e volume de eritrócitos, bem como a rugosidade da membrana, deformabilidade e alongamento dos eritrócitos. Para uma metodologia detalhada propomos a leitura dos artigos referenciados.^{658,698,699,705,706}

Os eritrócitos têm uma forma de disco bicôncavo (discócitos) e têm aproximadamente 8 μm de diâmetro e 2 μm de espessura. Essa forma única resulta numa diminuição da energia de flexão da membrana e um aumento na área de superfície em comparação com uma forma esférica, que é vantajosa pela sua deformabilidade através da capacidade de transferência de gás capilar e aumentada. A alteração da forma bicôncava típica do eritrócito pode ocorrer em função do ambiente (tratamento químico ou físico) ou em estados patológicos (doença ou envelhecimento).⁷⁰³

A aplicação do AFM para investigar a morfologia dos eritrócitos tem dois impactos principais. Em primeiro lugar, fornece uma caracterização precisa da morfologia dos eritrócitos. Em segundo lugar, facilita uma abordagem única para a análise da relação entre estrutura e função celular sob a influência de estímulos ambientais.

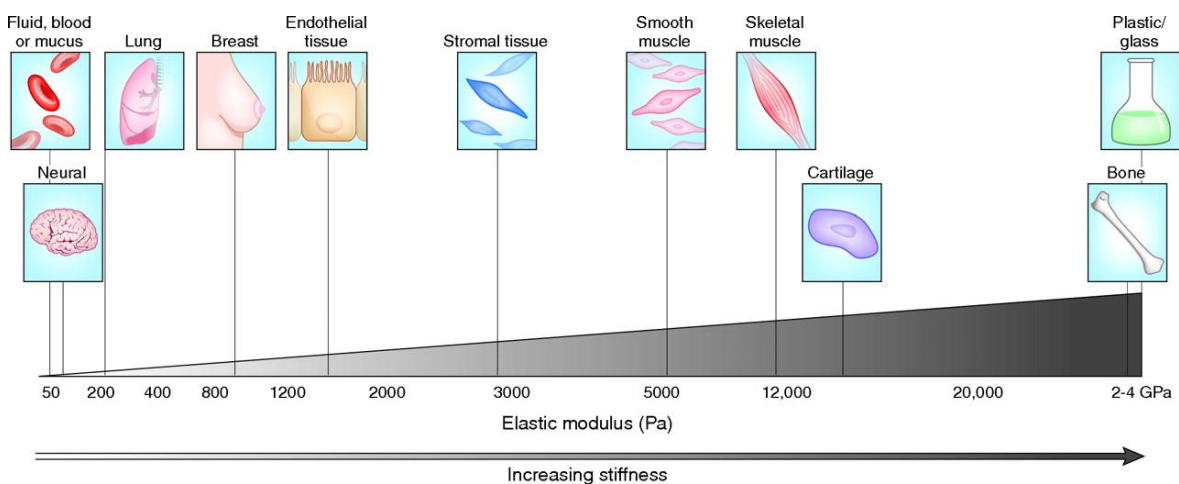


Figura 19 | Variações na rigidez dos tecidos.

As propriedades biomecânicas de um tecido em termos de rigidez (módulo de elasticidade), medidas em Pascal (Pa), variam acentuadamente entre órgãos e tecidos e estão inerentemente relacionadas à função do tecido.⁷⁰⁷

3.1.2. Metodologia ELISA e Tecnologia Multiplex

O radio-imunoensaio (RIA) foi descrito pela primeira vez em 1960, para a doseamento da insulina plasmática endógena por Solomon Berson e Rosalyn Yalow, do *Veterans Administration Hospital*, em Nova York. Yalow receberia mais tarde o Prêmio Nobel, em 1977, em Fisiologia e Medicina.^{708,709}

Estes ensaios iniciais usavam radiomarcadores para detecção. O RIA continuou a ser o padrão para a detecção de bioanálises por mais de dez anos, devido à sua extraordinária sensibilidade, apesar dos riscos à saúde e dos problemas de eliminação que eram impostos pela utilização de radioisótopos.

Pesquisando alternativas para substituir os isótopos radioactivos, a ELISA (Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*”) foi introduzida na década de 70 (1970).^{93,710} A técnica de ELISA utiliza uma reacção enzimática como base de detecção, em vez de um sinal radioactivo. Embora as versões iniciais não rivalizassem com a sensibilidade do RIA, o desenvolvimento de anticorpos monoclonais altamente específicos e a detecção por quimioluminescência resultaram em ensaios de ELISA com sensibilidade que excede a dos radiomarcadores. Hoje, as principais vantagens do método de ELISA são a sua facilidade de utilização, flexibilidade e baixo custo.

Os formatos de ELISA incluem os métodos directo, indirecto e sanduíche. Existe igualmente o método por competição que é mais utilizado quando o antigénio é pequeno e possui poucos epítomos, ou pontos de ligação com o anticorpo.⁷¹¹

No típico ensaio de ELISA em sanduíche com duplo anticorpo, o anticorpo ligado ao fundo de um poço indica tanto a captura do antigénio quanto a especificidade imunológica, enquanto outro anticorpo ligado a uma enzima indica detecção e um factor de amplificação. Essa abordagem permite a detecção precisa e sensível do antigénio, a citocina de interesse. Devido a estas características desejáveis, o ensaio de ELISA tem sido considerado um método padrão de medição de citocinas e é amplamente utilizado em laboratórios clínicos e pesquisas biomédicas.⁷¹¹ Os *kits* de ELISA para citocinas comumente medidos estão comercialmente disponíveis, muitas vezes de vários fornecedores. Uma vantagem adicional do método de ELISA é o facto de que ao mesmo tempo, vários pontos fracos deste método foram reconhecidos. O desempenho do método de ELISA é amplamente dependente da qualidade do anticorpo, fabricante do *kit*, bem como da experiência do operador. Além disso, o método de ELISA permite a medição de apenas uma citocina de cada vez, de uma determinada alíquota de amostra. Como discutido anteriormente, esta característica limita a capacidade do método de ELISA atender às necessidades dos pesquisadores de incluir números cada vez maiores de moléculas inflamatórias nos seus estudos. Essa preocupação torna-se especialmente emergente quando tais estudos requerem acesso a quantidades limitadas de material biológico. Dificuldades também existem na comparação de dois níveis de citocinas medidos por dois tipos de ELISA diferentes.⁷¹¹ Outra limitação dos ensaios baseados em ELISA é que o intervalo dinâmico (faixa sobre a qual existe uma relação linear entre a concentração de citocinas e a leitura da absorvância) é estreito, relativamente ao intervalo para outras

tecnologias, como ensaios multiplex. Assim, as amostras com concentrações de citocina acima da faixa dinâmica, deverão ser diluídas para o ensaio. A diluição não reduz apenas a concentração da citocina medida, mas também pode diminuir a concentração de quaisquer inibidores circulantes ou proteínas de ligação. O impacto das considerações anteriores é particularmente relevante para o uso de amostras de soro, exagerando as diferenças entre as amostras que possuem níveis de citocinas dentro da faixa dinâmica (não requerem diluição no ensaio) e amostras acima da faixa dinâmica (requer diluição da amostra).⁷¹¹

O crescimento da análise proteômica e genômica impulsionou a necessidade de descobrir e monitorizar um grande número de biomarcadores indicativos de estados de doenças humanas.

Princípios de Imunoensaios Multiplex Baseados em Esferas

O sistema de imunoensaio multiplex Bio-Plex® utiliza a tecnologia xMAP licenciada da Luminex® para permitir a multiplexação de até 100 testes diferentes dentro de uma única amostra. Essa técnica envolve 100 conjuntos de esferas coloridas distintamente criados pela utilização de dois corantes fluorescentes em proporções distintas. Estas pérolas podem ser ainda conjugadas com um reagente específico para um bioensaio particular. Os reagentes podem incluir antigénios, anticorpos, oligonucleótidos, substratos enzimáticos ou receptores. A tecnologia permite imunoensaios multiplex nos quais um anticorpo para um analito específico é ligado a um conjunto de esferas com a mesma cor, e o segundo anticorpo para o analito é ligado a um marcador corante *repórter* fluorescente. A utilização de diferentes esferas coloridas permite a detecção multiplex simultânea de muitos outros analitos na mesma amostra. Utiliza-se um citómetro de fluxo de detecção dupla para classificar os diferentes ensaios pelas cores dos grânulos num canal e determinar a concentração do analito medindo a fluorescência do corante repórter noutro canal (Figura 20).

Para a quantificação da IL-6 recorreremos a um ensaio Bio-plex®, conforme descrito de seguida:

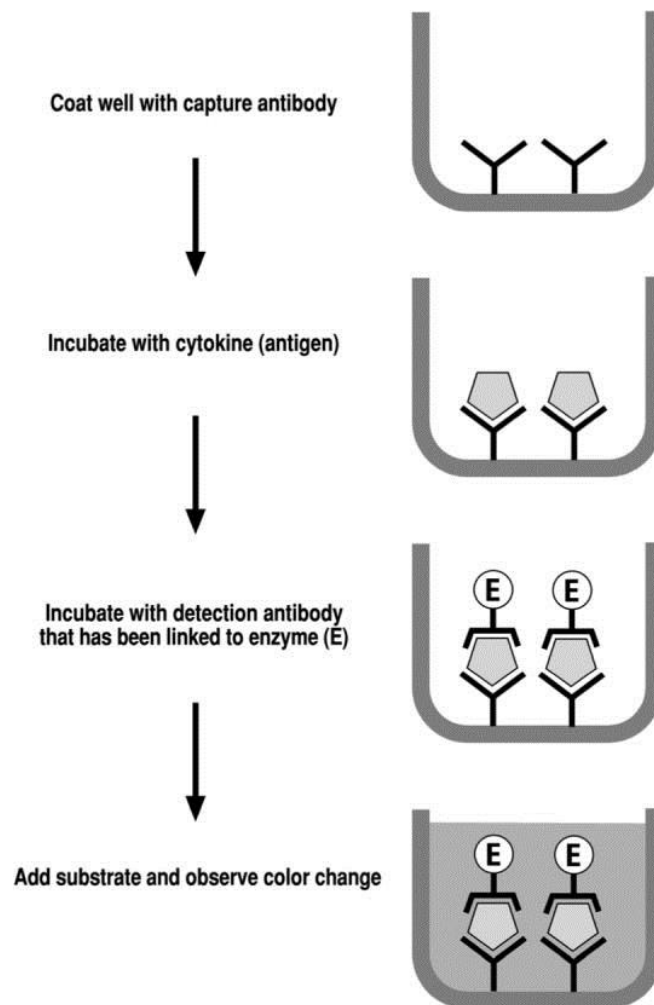
O sistema de matriz de suspensão Bio-Plex® é construído por três tecnologias. A primeira é a família de microesferas (contas) fluorescentes às quais as biomoléculas estão ligadas. O segundo é um citómetro de fluxo com dois *lasers* e óptica associada para medir as reacções bioquímicas que ocorrem na superfície das microesferas. O

terceiro é um processador de sinal digital de alta velocidade que processa eficientemente a saída da fluorescência.^{712,713}

O sistema de arranjo de suspensão Bio-Plex® utiliza a tecnologia multiplex patenteada, usando até 100 conjuntos de esferas codificadas por cores, cada uma das quais pode ser conjugada com um reagente específico. Cada reagente é específico para uma molécula alvo diferente. Ensaios de citocinas Bio-Plex® são num formato de imunoensaio em sanduíche de captura (*capture sandwich immunoassay*). O anticorpo especificamente dirigido contra a citocina de interesse é acoplado de forma covalente a esferas de poliestireno de 5,6 µm codificadas por cores. As esferas acopladas ao anticorpo são deixadas reagir com uma amostra contendo uma quantidade desconhecida de citocina, ou com uma solução padrão contendo uma quantidade conhecida de citocina.

Após a realização de uma série de lavagens para remover a proteína não ligada, o anticorpo de detecção biotinizado específico para um epítipo diferente na citocina é adicionada às microesferas. O resultado é a formação de uma sanduíche de anticorpos à volta da citocina. A mistura de reacção é detectada pela adição de estreptavidina-ficoeritrina (estreptavidina-PE), que se liga aos anticorpos de detecção biotinizados. Os constituintes de cada poço são elaborados no sistema de arranjo de suspensão Bio-Plex baseado em fluxo, que identifica e quantifica cada reacção específica com base na cor e na fluorescência da esfera. A intensidade da reacção é medida usando moléculas repórter fluorescentes associadas a cada proteína alvo. Concentrações de citocinas desconhecidas são automaticamente calculadas pelo software Bio-Plex Manager™ usando uma curva padrão derivada de um padrão de citocina recombinante. Usando esferas coloridas como a fase sólida em vez de um poço revestido, até 100 grânulos de cores diferentes podem ser misturados e utilizados para a quantificação de até 100 diferentes analitos simultaneamente.

a)



b)

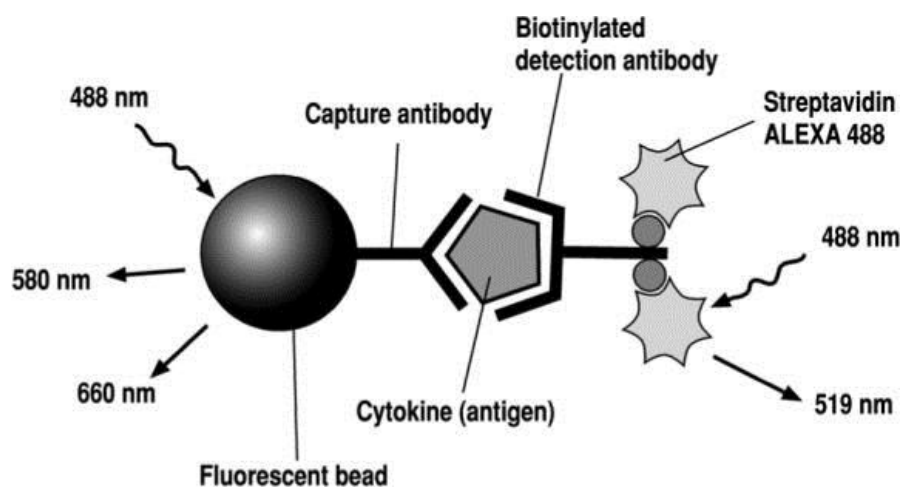


Figura20] Ilustração esquemática do princípio experimental para ensaio imunoenzimático (ELISA) e ensaios multiplex baseados em esferas.

a) Ilustra o protocolo básico da técnica de ELISA tradicional em sanduíche com duplo anticorpo; b) Conjuntos patenteados de esferas fornecem poder de detecção diferencial adicional em matrizes multiplex baseadas em microesferas. Ambas envolvem anticorpo de captura e anticorpo de detecção específico para a (s) citocina (s) de interesse, oferecendo especificidade imunológica. Enzima ou fluorocromo ligado ao anticorpo de detecção é o método de detecção com amplificação de sinal, oferecendo sensibilidade.⁷¹¹

Ensaio Multiplex

Semelhante à técnica de ELISA, a maioria dos ensaios é projectada de acordo com um formato de imunoensaio de sanduíche. Resumidamente, as esferas acopladas ao anticorpo de captura são primeiro incubadas com padrões de antigénio ou amostras durante um tempo específico. A placa é lavada para remover materiais não ligados, seguida de incubação com anticorpos de detecção biotinizados. Após a lavagem dos anticorpos biotinizados não ligados, as esferas são incubadas com um conjugado repórter estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE). Após a remoção do excesso de SA-PE, as esferas são passadas através do leitor de matriz, que mede a fluorescência do SA-PE ligado.^{712,709} (Figura 21)

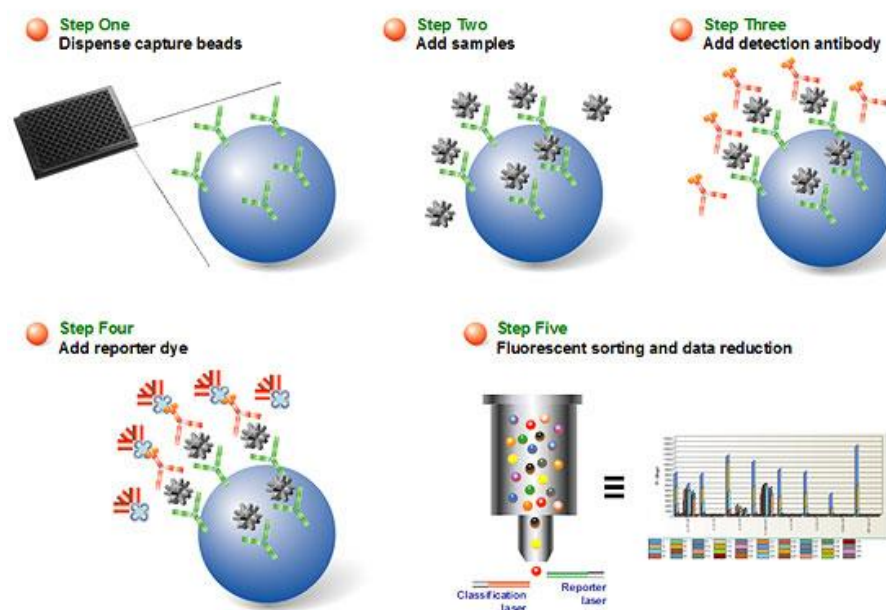


Figura 21 | Representação esquemática de um procedimento de ensaio baseado em imunoensaio de sanduíche.

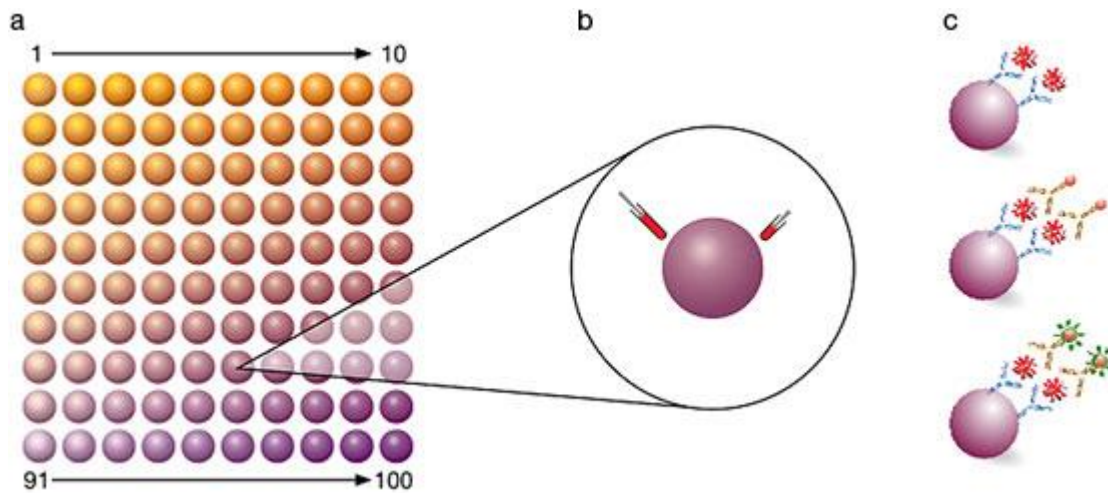


Figura 22 | Tecnologia de imunensaio multiplex.

As esferas são coloridas internamente com dois diferentes corantes fluorescentes (vermelho e infravermelho). Diferentes concentrações de corantes vermelhos e infravermelhos são usadas para originar até 100 regiões de esferas distintas. Cada região de esfera é conjugada com um analito alvo específico (a) seguido por ligação com um anticorpo de detecção biotilado (b) e um corante repórter, ficoeritrina conjugada com estreptavidina (c).^{712,714}

3.1.3. Parâmetros hemorreológicos

a) Agregação Eritrocitária

A agregação de eritrócitos é um dos factores mais importantes que afectam o fluxo sanguíneo. O aumento da agregação eritrocitária é um factor de risco cardiovascular, associado a condições clínicas como hipertensão e hipercolesterolemia. Sabe-se que "agregados patológicos" também ocorrem no enfarte do miocárdio, síndrome nefrótico e após o armazenamento prolongado de amostras de sangue.⁶⁷¹

A agregação eritrocitária ocorre quando as células discóides bicôncavas "aderem" face a face para formar os chamados "*rouleaux*", em condições com tensões de cisalhamento suficientemente baixas.^{658,671,715} A agregação de eritrócitos depende igualmente das tensões de cisalhamento locais, pois os agregados são reversíveis e facilmente divididos em agregados menores (ou células individuais) sob tensões crescentes de cisalhamento. Uma consequência importante dessa natureza dependente de cisalhamento da agregação eritrocitária é o comportamento não-*newtoniano* do sangue. A viscosidade do sangue aumenta com o aumento do número de agregados eritrocitários, mantendo mais células em *rouleaux* tridimensionais sob condições de baixo cisalhamento.^{671,715 658}

A agregação eritrocitária é um dos principais determinantes das propriedades reológicas *in vitro* do sangue.⁷¹⁶ Um aumento da agregação dos eritrócitos é uma consequência bem conhecida da lesão tecidual aguda, como enfarte do miocárdio, inflamação ou trauma; níveis plasmáticos aumentados de um grupo de proteínas conhecidas como de fase aguda são responsáveis por esse aumento.⁶⁷¹

A agregação eritrocitária pode ser influenciada por factores bioquímicos, hemorreológicos e hemodinâmicos. Em baixas taxas de cisalhamento observadas no sistema venoso, um aumento na agregação de eritrócitos induz um aumento na viscosidade do sangue e, conseqüentemente, a velocidade sanguínea reduzida.⁷¹⁷ O mecanismo de agregação dos eritrócitos, resulta de um aumento nas proteínas de adesão ao plasma, como o fibrinogénio.^{658,718} O fibrinogénio e outras proteínas plasmáticas promovem a agregação de eritrócitos, com agregação dependente da magnitude das forças de cisalhamento que actuam nas células.^{658,671} Essa tendência aumentada para a agregação dos eritrócitos está também relacionada com a diminuição da densidade de carga na superfície e a redução da repulsão electrostática entre eritrócitos adjacentes.⁶⁷¹

b) Deformabilidade Eritrocitária

Os eritrócitos transportam oxigénio e precisam atravessar os capilares do sistema microvascular com diâmetros internos de 4-5µm. Em condições normais, os eritrócitos deformam-se o suficiente para atravessar essas passagens estreitas. A deformabilidade celular, definida como a capacidade de uma célula adoptar uma nova forma em resposta a forças deformantes, é essencial para a perfusão de tecidos microvasculares.^{658,719} A deformabilidade eritrocitária pode ser modificada por diversas alterações estruturais e funcionais dos eritrócitos originadas por factores genéticos ou ambientais. Sabe-se que a redução da deformabilidade dos eritrócitos sob certas condições fisiológicas ou patológicas resulta no retardamento do fluxo sanguíneo através da microcirculação. Os eritrócitos são extremamente deformáveis porque podem alongar-se progressivamente sob tensão de cisalhamento. Em maior tensão de cisalhamento, os eritrócitos respondem alongando-se nos capilares. Assim, eles são capazes de entrar e transitar em vasos sanguíneos com diâmetros menores. Quando as células deformam, a respectiva área de superfície permanece fixa. A membrana eritrocitária resiste à dilatação da sua área e só rompe acima de 2-3% da sua área de expansão.⁶⁵⁸

A forma e a estrutura únicas dos eritrócitos conferem-lhes propriedades mecânicas especiais. Os eritrócitos comportam-se como corpos elásticos e, assim, a mudança de forma é reversível quando as forças deformantes são removidas. Os eritrócitos também exibem comportamento viscoso e respondem como um corpo viscoelástico. A membrana dos eritrócitos pode apresentar alterações plásticas sob algumas circunstâncias patológicas e pode ser permanentemente deformada por forças de cisalhamento excessivas.⁶⁷¹ As propriedades de viscosidade elástica e citoplasmática da membrana são factores determinantes para a deformabilidade dos eritrócitos. A deformabilidade dos eritrócitos pode ser quantificada através da monitorização das mudanças no formato das células pela aplicação de forças.⁶⁷¹ Em condições saudáveis, os eritrócitos podem passar capilares com diâmetros menores que o tamanho das células, mas se ocorrer coagulação, o fluxo sanguíneo pode parar. Processos patológicos podem resultar da deterioração reversível ou irreversível do comportamento reológico dos eritrócitos.⁶⁷¹

A manutenção da deformabilidade normal dos eritrócitos depende da disponibilidade de energia metabólica na forma de adenosina trifosfato (ATP). O ATP é necessário para as bombas de cationes na membrana dos eritrócitos (isto é, $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ e $\text{Ca}^{2+}\text{ATPase}$) que servem para regular o catione intracelular e o teor de água, mantendo assim o volume celular e, portanto, a relação superfície/volume da célula.^{671 720}

Além do equilíbrio hidro-eletrolítico do eritrócito e, portanto, do volume e da viscosidade citoplasmática, as propriedades mecânicas da membrana celular são os principais determinantes da sua deformabilidade. O aumento da concentração de cálcio citosólico é uma alteração frequentemente detectada associada à deformabilidade reduzida dos eritrócitos.⁶⁷¹

c) Viscosidade Total Sanguínea

A viscosidade do sangue e plasma é um dos principais factores que afectam o fluxo sanguíneo e a circulação normal. A viscosidade do sangue total é principalmente afectada pela viscosidade do plasma, deformabilidade do eritrócito, hematócrito e outros factores fisiológicos. O aumento da viscosidade sanguínea foi associado ao desenvolvimento de múltiplos distúrbios relacionados com o dano do endotélio vascular. Tem igualmente uma correlação entre a viscosidade do sangue e as patologias cerebrovasculares.^{658,721} A viscosidade plasmática depende da concentração de proteínas plasmáticas e possui propriedades de fluido *newtoniano*.

A viscosidade plasmática foi considerada como um marcador de doença aguda devido ao aumento das proteínas plasmáticas, nomeadamente o fibrinogénio. Sabe-se que o fibrinogénio aumenta a resistência no fluxo sanguíneo na microcirculação; como resultado, a propriedade não-newtoniana do sangue diminui, causando aumento na viscosidade do sangue e diminuição no fluxo sanguíneo; apesar da circulação colateral estar frequentemente presente, o fornecimento e a extracção de oxigénio são igualmente prejudicados; o fibrinogénio aumenta o risco de distúrbios tromboembólicos induzidos pela viscosidade que é resistente à acção do anticoagulante; também o anticoagulante é ineficaz na redução ou melhoria da hiperviscosidade.^{41,721} O aumento da viscosidade sanguínea induz dano endotelial, inflamação, hipertrofia da parede vascular, agregação plaquetária e deterioração da tensão de cisalhamento dos vasos sanguíneos; todos esses factores aumentam os riscos de acidente vascular cerebral e isquémia cardíaca.⁷²¹

O grau de perturbação das linhas de fluxo e conseqüentemente a viscosidade do sangue é, portanto, fortemente dependente do hematócrito. A viscosidade do sangue depende da viscosidade do plasma em combinação com o hematócrito. Diferenças de género na viscosidade do sangue estão relacionadas com a rigidez e envelhecimento dos eritrócitos. Existem grandes diferenças na viscosidade do sangue total entre homens e mulheres jovens no período reprodutivo. Para sangue normal a 37°C, a viscosidade do sangue a elevada taxa de cisalhamento (100 ~ 200 s⁻¹) é medida como 4 ~ 5 cP.^{658,722}

3.1.4. Análise das medidas de Potencial Zeta da Superfície da Membrana dos Eritrócitos

A maioria dos líquidos contém iões e uma partícula carregada é suspensa numa solução de uma carga oposta que será atraída para a superfície da partícula suspensa.⁷²³ A camada líquida que envolve a partícula existe como duas partes, uma região interna, onde os iões estão fortemente ligados. A região interna é constituída por iões positivos que são chamados de contra-iões. A atracção da superfície da membrana carregada negativamente faz com que alguns dos iões positivos formem uma camada firmemente conectada. A segunda camada é a camada difusa, onde os iões se difundem mais livremente, menos firmemente associados e são compostos por iões negativos e positivos. Isso causa um equilíbrio dinâmico, porque os iões

positivos ainda são atraídos pelo colóide negativo, mas são repelidos, pela camada interna (Figura 23).⁷²⁴

A membrana dos eritrócitos contém proteínas e glicoproteínas incorporadas numa bicamada lipídica fluida que confere um comportamento viscoelástico. As glicoproteínas sializadas (contendo ácidos siálicos) da membrana eritrocitária são responsáveis por uma superfície carregada negativamente, o que cria um potencial zeta eléctrico repulsivo (ζ)^{724,725} entre as células.

O ζ -potencial é utilizado como uma combinação de duas técnicas de medição: electroforese e velocimetria *laser-doppler*.^{658,723,726}

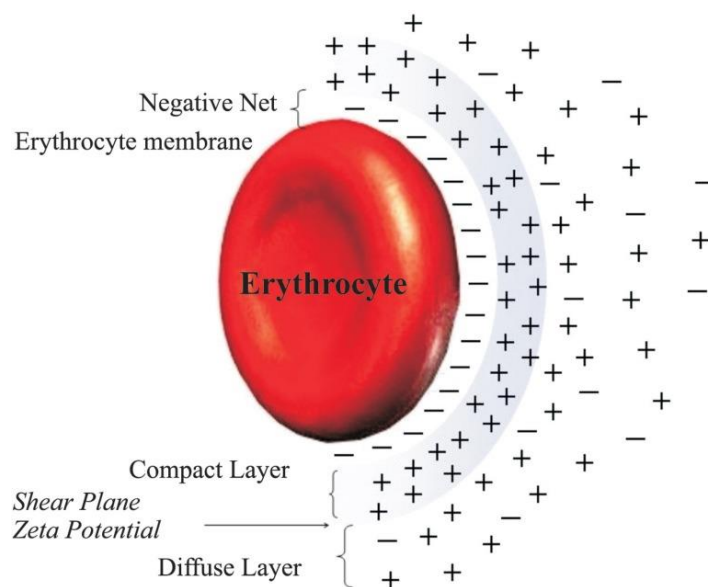


Figura 23| Representação esquemática do potencial zeta.

Eritrócitos (cargas negativas) em suspensão causando um rearranjo de cargas através da formação de duas camadas iónicas que originam uma diferença de potencial eléctrico entre elas, chamada de potencial Zeta.⁷²⁴

O zetasizer Nano Series calcula o potencial determinando a mobilidade electroforética e aplicando a equação de *Henry*.

$$\zeta = \frac{3\eta u}{2\epsilon f(ka)}$$

Onde η é a viscosidade do solvente, u é a mobilidade electroforética, ϵ é a constante dieléctrica e $f(ka)$ é a função de *Henry*. O valor desta função é considerado 1,5 quando as partículas são suspensas em soluções aquosas com alta força iónica (aproximação

de Smoluchowski, que se ajusta bem a condições fisiológicas) e 1 quando meios não aquosos são usados (aproximação de *Huckel*). Usando esta abordagem simples, o potencial de carga superficial de moléculas em solução e a mudança neste parâmetro, como resultado de interações com ligandos biologicamente relevantes, podem ser facilmente monitorizadas. Assim, permitindo a determinação do papel das cargas nas interações biológicas. O potencial zeta de uma partícula é proporcional à sua carga superficial.^{37,658}

O desenvolvimento de uma carga líquida na superfície da partícula afecta a distribuição de iões na região interfacial circundante. A magnitude do potencial dá uma indicação da potencial estabilidade do sistema coloidal.

3.1.5. População: Critérios de Inclusão e de Exclusão

Para todos os estudos, o diagnóstico de ELA foi estabelecido por avaliação clínica e electromiográfica, outros exames tais como de rotina laboratorial, estudos de imagem e análise do líquido cefalorraquidiano, para a exclusão de patologias que possam mimetizar a ELA, foram realizados conforme indicado.⁸³ Todos os doentes incluídos nos estudos foram categorizados como ELA definitiva, provável ou possível, de acordo com os critérios revistos do *El Escorial*⁸³ e com achados electrofisiológicos consistentes com os critérios de *Awaji*.⁸⁴ Foram excluídos mulheres grávidas, doentes com grave envolvimento funcional (ALSFRS-R <25),⁷²⁷ ou com sintomas de disfunção respiratória, doenças pulmonares ou cardíacas, psiquiátricas ou com clínica de demência. Foram excluídos fumadores, uma vez que poderiam influenciar os resultados. Não foram incluídos pacientes sujeitos a ventilação não-invasiva ou gastrostomizados. Todos os doentes estavam a tomar Riluzol.¹¹⁵ Como recomendado, os pacientes, tratados com Riluzol realizaram testes sanguíneos de rotina a cada 3 meses para avaliação da função hepática.¹²⁴ Aproveitando esta recomendação e com permissão prévia do doente e de acordo com o aprovado pela Comissão de Ética, testes sanguíneos adicionais foram realizados para identificar novos biomarcadores de disfunção respiratória.

Os estudos foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética do Centro Académico de Medicina de Lisboa. Os sujeitos incluídos concederam consentimento informado e assinado, de acordo com os termos aprovados pela Comissão de Ética.

Os pacientes foram clinicamente avaliados no momento da colheita da amostra de sangue, ou num intervalo de tempo curto (no caso do estudo da creatinina), assim como nas consultas subsequentes, tendo sido registado o valor do ALSFRS-R, o *subscore* respiratório (*Subscore R*) desta escala, a capacidade vital forçada (FVC), e valor médio da amplitude da resposta motora do diafragma após electroestimulação do nervo frénico (*PhrenAmpl*) bilateralmente. Os valores foram relacionados com os resultados laboratoriais.

Foram registados, nas consultas de seguimento, os valores da escala funcional, o FVC e o índice de massa corporal (IMC). Foi registada a data de morte dos doentes.

3.1.6. Protocolo Clínico

Os sintomas respiratórios foram avaliados pela aplicação da escala funcional da ELA (ALSFRS-R),⁷²⁷ com quantificação do *subscore* respiratório, *Subscore R* (0-12). A taxa de progressão da doença foi calculada aquando da primeira consulta pela taxa de declínio da escala funcional⁴² (valor estimado de ALSFRS-R/meses de duração da doença).

3.1.7. Testes da Função Respiratória

Testes de função respiratória foram realizados pela avaliação da capacidade da FVC (*Pony Fx, Cosmed*), na posição sentada, tendo sido registada sob a forma de percentagem da FVC obtida em relação ao valor predito (%FVC). O melhor dos três testes satisfatórios foi utilizado para definir a %FVC.

A amplitude da resposta motora diafragmática pela estimulação do nervo frénico (*PhrenAmpl*) foi obtida por estimulação eléctrica percutânea, bipolar, do nervo frénico, no pescoço, utilizando eléctrodos de registo superficiais, bilateralmente. As respostas foram registadas com eléctrodos superficiais. Cinco respostas consistentes foram consideradas em cada lado, com registo da mais ampla. O valor médio do *PhrenAmpl* de ambos os lados ($\text{PhrenAmpl direito} + \text{PhrenAmpl esquerdo}/2$), foi usado na análise.

3.1.8. Biomarcadores

Durante o desenvolvimento desta tese, foram aplicadas diferentes técnicas e metodologias de forma a atingirmos os objectivos. Destaca-se a utilização da microscopia de força atómica, assim como outras técnicas biofísicas, hemorreológicas e de biologia molecular.

Na tabela 10, descrevem-se os principais objetivos do estudo, os parâmetros e técnicas que integraram os trabalhos desta tese.

Tabela 10| Resumo das técnicas utilizadas e respectivos parâmetros analisados

Técnica	Parâmetros	Objetivo
ELISA* e Multiplex** Método Jaffé***	CC-16* IL-6** Creatinina*** Fibrinogénio γ' *	Identificação de novos biomarcadores de disfunção respiratória na ELA
AFM Morfologia dos Eritrócitos	Área Diâmetro Altura Volume Alongamento Rugosidade	Caracterização biofísica e análise hemorreológica dos eritrócitos na ELA
AFM Elasticidade Eritrócitos	Módulo de Young (<i>Young Modulus</i>) Profundidade de Penetração (<i>Penetration Depth</i>)	
Hemograma	Hb, Ht, MCV, RDW, PLT, NLR	
Hemorreologia	Agregação eritrocitária Deformabilidade eritrocitária Viscosidade sanguínea	
Potencial Zeta	Superfície da membrana dos eritrócitos	

Abreviaturas da tabela: ELA| Esclerose lateral amiotrófica, Hb| Hemoglobina; Ht| Hematócrito; MCV| Volume globular Médio; RDW| Amplitude da distribuição dos eritrócitos; PLT| Plaquetas; NLR| Razão neutrófilos/ linfócitos. * Quantificado por metodologia de ELISA; **Quantificado por tecnologia Multiplex; *** Quantificado por método Jaffé.

3.2 IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES DE DISFUNÇÃO RESPIRATÓRIA NA ELA

3.2.1. Objectivos

Com o objectivo de identificar novos biomarcadores de disfunção respiratória e de inflamação, na ELA, avaliaram-se os seguintes: a CC-16;⁵²⁹ a IL-6,⁵²⁷ a creatinina e o fibrinogénio γ . Os dois primeiros trabalhos foram já publicados. (Artigos em ANEXO).

3.2.2. População

CC-16

Para a quantificação da CC-16, estudámos 81 pacientes com ELA observados no nosso centro, 45 Homens e 36 Mulheres, com idade média de 60 anos (SD=11,4) e a duração média de doença 27 meses (SD=43,4). Neste grupo, 61 pacientes tinham forma medular, 16 bulbar e 4 início respiratório. No mesmo período e utilizando a mesma metodologia, estudámos 30 controlos saudáveis não fumadores, emparelhados em género e idade, de modo a definir os nossos valores normativos.

IL-6

Na quantificação da IL-6, estudámos 82 pacientes com ELA seguidos em nosso centro. 57 Homens e 25 Mulheres, com idade média de 60,5 anos (SD=9,9) e a duração média de doença 27,5 meses (SD=43,7). Neste grupo, 65 pacientes tinham forma medular e 17 bulbar. No mesmo período e usando a mesma metodologia, estudámos 43 controlos, com a mesma distribuição por sexo e idades.

Creatinina

Os dados foram obtidos pela análise da base de dados dos doentes de ELA observados no nosso centro, integrados no Projecto Europeu *OnWebDuals*. Estudámos 233 indivíduos (n=233), 131 do sexo masculino (56,2%) e 102 indivíduos do sexo feminino (43,8%). Posterior consulta dos processos permitiu complementar a informação, quando necessário. Foi seguido o desenho de um estudo retrospectivo.

Fibrinogénio Gamma (γ)

Estudámos propectivamente 69 pacientes consecutivos com ELA seguidos no nosso centro. No mesmo período e usando a mesma metodologia, estudámos 82 controlos saudáveis. A amostra de pacientes de ELA foi constituída por 40 homens (57,97%) e 29 mulheres (42,03 %), com idade média de 63,22 (SD=3,78) e a duração média de doença 23,03 meses (SD=20,45).

A população de controlos foi constituída por 46 homens (56,10%) e 36 mulheres (43,90%) com idade média de 46,99 (SD=11,63).

3.2.3. Metodologia

Quantificação plasmática da Proteína CC-16

Para determinação dos níveis plasmáticos da proteína CC-16, foi colhido sangue total para tubos de vácuo, com heparina de lítio e imediatamente centrifugados 3500 RPM durante 10 minutos. O plasma foi separado para tubos de congelação apropriados e imediatamente congelado a -80°C até serem analisados. As concentrações plasmáticas humanas de CC-16 foram medidas utilizando o *Kit Human Clara Cell Protein-Biovendor-Modrice*,⁷²⁸ (ELISA-Imunoensaio enzimático quantitativo em *sanduíche*) de acordo com as instruções do fabricante.⁷²⁸

Neste teste de ELISA, os padrões, controlos de qualidade e amostras são incubados em poços de microplaca pré-revestidos com anticorpo policlonal anti-célula humana. Após 60 minutos de incubação e lavagem, o anticorpo policlonal anti proteína humana CC-16, marcado com biotina é adicionado e incubado com a proteína CC-16 capturada durante 60 minutos.

Após outra lavagem, adiciona-se conjugado de estreptavidina-peroxidase (*streptavidin-horseradish peroxidase*). Após 60 minutos de incubação e o último passo de lavagem, o restante conjugado vai reagir com a solução de substracto (TMB). A reacção é parada por adição de solução ácida e mede-se a absorvância do produto amarelo resultante. A absorvância é proporcional à concentração da proteína CC-16 presente na amostra. Uma curva padrão é construída com os valores de absorvância de concentrações de padrões. As concentrações de amostras desconhecidas são determinadas usando esta curva padrão.

Cada amostra foi executada em duplicado e a concentração média da proteína foi calculada. A concentração de CC-16 presente em cada amostra foi determinada por

comparação com uma curva padrão preparada com concentrações conhecidas da proteína.

Quantificação plasmática da IL-6

Para determinação dos níveis plasmáticos da IL-6, o sangue total foi colhido para tubos de vácuo com heparina de lítio e imediatamente centrifugados a 3500 RPM, durante 10 minutos. O plasma foi separado para tubos de congelação apropriados e imediatamente congelado a -80°C até a análise. As concentrações plasmáticas de IL-6 foram quantificadas no plasma por tecnologia Multiplex®.

As concentrações de IL-6 no plasma humano foram medidas usando o ensaio *Bioplex Pro Chemokine* (Biorad Bio-Rad® *Bio-Plex Pro*™) realizado de acordo com as instruções do fabricante usando um sistema *Bio-Plex 200* e o software *Bio-Plex Manager 5* (todos da *Bio-Rad*). Para a medição dos níveis plasmáticos de IL-6, a medição da IL-6 foi realizada em duplicado para cada amostra e a concentração média foi calculada. A concentração de IL-6 foi obtida pela interpolação da intensidade da fluorescência na curva padrão de 7 pontos obtida usando a proteína recombinante fornecida no *kit* e calculada usando o software *Bio-Plex Manager 5*.

Quantificação plasmática da Creatinina

O doseamento da creatinina foi efectuado pelo método colorimétrico de *Jaffé*. Para a quantificação da creatinina, a reacção de *Jaffé*, ocorre entre a creatinina e o ião picrato que se forma em meio alcalino, originando um composto corado-vermelho alaranjado, que é posteriormente quantificado por espectrofotometria num comprimento de onda de 485- 520nm.^{648,649,729,730} Os valores da creatinina foram registados em mg/dL. Nos homens, o intervalo de referência para a creatinina é entre 0,6–1,2 mg/dL; nas mulheres é entre 0,5–0,9 mg/dL.⁷³¹

Quantificação plasmática do fibrinogénio γ'

Para determinação dos níveis plasmáticos do fibrinogénio γ' , o sangue total foi colhido para tubos de vácuo com K₃EDTA e imediatamente centrifugados 3000 RPM durante 10 minutos. O plasma foi separado para tubos de congelação apropriados e imediatamente congelado a -80°C até a análise. As concentrações plasmáticas do fibrinogénio γ' foram quantificadas no plasma por metodologia de ELISA.

A quantificação da concentração de fibrinogénio γ' foi efectuada em amostras de plasma humano. Usou-se um método ELISA quantitativo semi-automático que

consiste num imunoensaio em sanduíche (Gamma Coeur Test Kit, *Gamma Therapeutics, Inc., Portland, Oregon*). O fibrinogénio γ' presente na amostra liga-se a um anticorpo monoclonal específico para essa proteína que foi revestido na placa de 96 poços. A análise de cada amostra foi efectuada em duplicado. Após a incubação, as moléculas de fibrinogénio γ' não ligadas, tais como o fibrinogénio $\gamma A\gamma A$ e outros componentes do plasma são removidos por lavagem sequencial. Posteriormente foi adicionado anticorpo secundário policlonal marcado com peroxidase (*Horse radish peroxidase (HRP)*) que se liga ao fibrinogénio γ' capturado, formando um complexo “capture antibody/analyte/detection antibody” sandwich. O anticorpo de detecção em excesso é removido por várias lavagens sequenciais e é adicionado um substrato para o detector marcado com HRP originar um produto corado. De seguida é adicionada uma solução STOP a cada poço, de modo a parar a reacção. A absorvância do produto final de cor amarela é lida num espectrofotómetro a um comprimento de onda de 450 nm. A média, das leituras de cada poço, lido em duplicado, foi calculada para cada amostra (dadores saudáveis e pacientes com ELA) e os resultados dos padrões foram confirmados.^{36,41,732} Oito soluções de fibrinogénio γ' , com concentrações aumentadas de fibrinogénio foram usadas como calibradores numa curva de calibração padrão.⁷³²

O valor de referência para o fibrinogénio γ' é inferior a 30 mg/dL. Concentrações de fibrinogénio γ' superiores a este valor são associados a possível aumento do risco de eventos cardiovasculares no indivíduo.

3.2.4. Análise Estatística

CC-16

A distribuição normal dos dados foi confirmada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. As comparações foram feitas com o teste do Chi-quadrado para dados categóricos e com *t-Student* não-emparelhado para medidas contínuas. O coeficiente de correlação de *Pearson* foi aplicado para testar a correlação entre os dados. Curvas de *Kaplan-Meier* foram realizadas para avaliar o valor prognóstico do nível de CC-16 na sobrevida. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Para comparações múltiplas foi aplicada a correção de *Bonferroni* ($p < 0,05/n$).

IL-6

Os resultados da IL-6 foram transformados logaritmicamente para obter uma distribuição normal de forma a aplicar o teste *t* de *Student* não-emparelhado, para comparação. A correlação de *Spearman* foi aplicada para testar as correlações. Um valor de $p < 0,05$ foi aceite como significativo. Curvas de *Kaplan-Meier* foram realizadas para avaliar o valor prognóstico do nível anormal de IL-6 na sobrevida. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Para comparações múltiplas foi aplicada a correcção de *Bonferroni* ($p < 0,05/n$).

Creatinina

Para o estudo das variáveis dependentes e independentes e para a relação entre elas, foi efectuada a análise de regressão múltipla, para um nível de significância de $\alpha = 0,05$. Para comparações múltiplas foi aplicada a correcção de *Bonferroni* ($p < 0,05/n$). Comparou-se a evolução das várias variáveis dependentes, longitudinalmente, entre um grupo de doentes com valores de creatinina superiores à mediana *versus* um grupo de doentes com valores inferiores à mediana, recorrendo à técnica de *Median-Split*.

O estudo da interacção género-creatinina foi efectuada através de testes *F* com base nos coeficientes obtidos nas várias regressões múltiplas, tendo-se codificado o sexo masculino como “0” e o sexo feminino como “1”.

Por último, o estudo da mortalidade, tendo como base a influência das várias variáveis independentes (preditoras de sobrevida), entre as quais a creatinina, foi efectuada através da regressão de risco proporcional de *Cox*. Recorrendo à técnica de *Median-Split*, comparou-se a sobrevivência de um grupo de doentes com valores de creatinina superiores à mediana *versus* um grupo de doentes com valores inferiores à mediana. Um ponto de corte de 60 meses após o diagnóstico foi estabelecido para o estudo da mortalidade.

Fibrinogénio *Gamma* (γ')

Os grupos foram comparados com o *t* de *Student* não-emparelhado. Foi efectuada análise com regressão múltipla, para estudo das co-variáveis que determinam as diferenças entre grupos. O valor do fibrinogénio γ' como preditor da mortalidade foi investigado através da regressão de risco proporcional de *Cox*. Foi considerado um nível de significância de $\alpha = 0,05$.

As análises estatísticas foram realizadas nos programas *SPSS Statistics*, *MATLAB R2015A*® e *GraphPad Prism 5.03*.

3.3. CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA, MORFOLÓGICA E ANÁLISE HEMORREOLÓGICA DOS ERITRÓCITOS NA ELA

3.3.1. Objectivos

Foi objectivo deste estudo, através de estudos de nanoindentação em AFM, caracterizar as alterações morfológicas e as propriedades elásticas dos eritrócitos, nos doentes com ELA, em comparação com controlos saudáveis. A avaliação por AFM das alterações morfológicas das células incluiu a medição de parâmetros como o diâmetro, a altura, a área, o volume, a elasticidade (módulo de *Young*), a deformabilidade, o alongamento e a rugosidade da membrana dos eritrócitos. Adicionalmente, foi investigado o potencial Zeta na superfície da membrana dos eritrócitos. De forma a interpretar diferenças, foi igualmente realizado o estudo do hemograma nas populações. Os dados foram registados, nomeadamente: hemoglobina, hematócrito, RDW (*Red cell distribution*), MCV (*mean corpuscular volume*), razão do número total de neutrófilos/linfócitos e plaquetas.

Este estudo foi realizado em colaboração com a Unidade de Investigação de Biomembranas e Nanomedicina liderada pelo Professor Doutor Nuno Santos.

3.3.2. População

Nas análises de AFM, foram incluídos 23 pacientes consecutivos com ELA seguidos no nosso centro. No mesmo período e usando a mesma metodologia, estudámos 17 controlos saudáveis, emparelhados para sexo e idade.

A amostra de pacientes de ELA foi constituída por 13 homens (56,52%) e 10 mulheres (43,48 %), com idade média de 65,78 (SD=9,86) e a duração média de doença 37,87 meses (SD=56,27).

A população de controlos foi constituída por 8 homens (47,06%) e 9 mulheres (52,94%) com idade média de 44,48 (SD=13,59).

Os critérios de inclusão e exclusão foram semelhantes aos utilizados nas análises anteriores. As avaliações clínicas e respiratórias dos doentes foram já descritas no *item* anterior.

3.3.3. Metodologia

Hemograma

O hemograma foi quantificado usando sangue total colhido em tubos contendo K₃EDTA. A análise foi efectuada num analisador hematológico (*PocH-100iV* - Analisador Hematológico, *Sysmex Europe GmbH*, Hamburgo, Alemanha). O hemograma permite a contagem de cada um dos elementos das células sanguíneas humanas e compara estes resultados com intervalos de referência para cada parâmetro.⁶⁷¹

Microscopia de Força Atómica (AFM)

Um microscópio de força atómica *NanoWizard II* (*JPK Instruments*, Berlim, Alemanha) montado no topo de um microscópio óptico invertido *Axiovert 200* (*Carl Zeiss*, Jena, Alemanha) foi usado para experiências de imagem e espectroscopia de força durante este trabalho.

Em paralelo com estudos de AFM foi efectuada a análise do potencial zeta da superfície da membrana eritrocitária.

a) Scan de Imagens de Células Sanguíneas Humanas por AFM

A cabeça do AFM é equipada com um *scanner* piezoeléctrico linearizado com alcance em z de 15 µm e um laser de luz infravermelha. A imagem dos eritrócitos foi realizada, em ar, em modo contacto intermitente. Para tal, uma gota de sangue total foi depositada numa lâmina de vidro e efectuada um esfregaço de sangue que foi seco ao ar. Pontas de silício oxidadas e finas com um raio de ponta de ~ 6 nm, frequência de ressonância de cerca de 60 kHz e constante de mola de 3 N/m foram usadas para efectuar as imagens de eritrócitos. Parâmetros de imagem foram ajustados para minimizar a força aplicada no varrimento da topografia das células. A velocidade de varrimento foi optimizada para 0,3 Hz e os pontos de aquisição foram 512 × 512. Os dados de imagem foram analisados com o *software JPK Image Processing v.5.1.8* (*JPK Instruments, Berlin, Germany*). O diâmetro, a área, a altura e o volume de cada célula foram quantificados utilizando o *software SPIP v.6.6.0* (*Image Metrology, Hørsholm, Dinamarca*). A rugosidade dos eritrócitos também foi analisada pelo *software Gwyddion v.2.45* (*Czech Metrology Institute, República Tcheca*).^{658,699,733}

b) Espectroscopia de Força baseada em AFM

Para as experiências de AFM, os eritrócitos foram isolados do plasma sanguíneo. Em seguida, as células foram suspensas no hematócrito final a 0,1% com tampão de glicose-citrato salino (BSGC) (KH_2PO_4 1,6 mM, Na_2HPO_4 8,6 mM, NaCl 0,12 M, citrato de sódio 13,6 mM e glicose 11,1 mM) pH 7,3 com CaCl_2 (1 mM). Posteriormente, a solução foi colocada numa lâmina de vidro revestida com poli-L-lisina e permitiu que os eritrócitos aderissem firmemente, por 30 minutos.^{699,702,705} As células que não aderiram à lâmina de vidro foram removidas por lavagens sequenciais com tampão BSGC.

c) Nanoindentação – Determinação da Elasticidade dos Eritrócitos

Para experiências de indentação de eritrócitos, foram utilizadas pontas de nitreto de silício não funcionalizadas *OMCL TR-400* (Olympus, Japão). Utilizaram-se os *cantilevers* triangulares mais macios, com um raio de ponta de ~ 15 nm e uma frequência de ressonância de 11 kHz. As constantes de mola elástica das pontas foram calibradas pelo método de ruído térmico com valor nominal de 0,02 N / m. Para cada contacto entre a célula e o *cantilever*, a distância entre o *cantilever* e a célula foi ajustada para manter uma força máxima aplicada de 300 pN para eritrócitos de pacientes com ELA antes da retracção. A elasticidade celular foi medida num ponto de cada eritrócito (5 curvas força-distância por célula). A colheita de dados para cada ciclo de força-distância foi realizada em 1,5 Hz, com um intervalo de deslocamento em z de 4 μm . Curvas de força foram efectuadas no centro da célula. Os dados obtidos das experiências de nanoindentação (curvas de força) foram analisados para obtenção do módulo de *Young* (E), utilizando o *software JPK Image Processing v.5.1.8*, pela aplicação do modelo Hertziano. Os resultados dos histogramas do módulo de *Young* foram construídos para cada condição experimental estudada. O tamanho ideal da classe do histograma foi escolhido para se obter o melhor ajuste ao pico do modelo gaussiano. Os valores máximos dos picos gaussianos representam diferentes estatísticas do módulo de *Young* das células. A profundidade de penetração da ponta AFM nos eritrócitos também foi avaliada. Este parâmetro foi analisado pela posição do movimento máximo do sensor piezoelétrico no eixo z, que corresponde à coordenada do eixo z quando o sensor atinge uma força de indentação de 300 pN para eritrócitos de pacientes com ELA, subtraindo-se o eixo z na posição do sensor quando a ponta inicia o contacto com a superfície do eritrócito.^{658,705,734}

Parâmetros Hemorreológicos

a) Agregação Eritrocitária

Preparação / medição de amostras

A suspensão de células sanguíneas foi preparada com diferentes concentrações de fibrinogénio (fracção I, tipo I, plasma humano, *Sigma*, ref. F-3879) (0, 20, 40, 60, 80 mg / dL) em NaCl 0,9% que foram adicionadas a 500 μ L de sangue humano. O sangue foi colhido em tubo com anticoagulante de heparina. As suspensões foram incubadas por um período de 30 minutos, à temperatura ambiente. A agregação dos eritrócitos foi medida num agregómetro *Myrenne (modelo MA-1, Myrenne GmbH, Roetgen, Alemanha)*. O sistema mede a transmissão de luz infravermelha através de uma suspensão de eritrócitos entre uma placa transparente e um cone, em estase durante 5 s e 10 s após a dispersão das amostras de sangue ou rotação na tensão de cisalhamento de 600 s^{-1} .^{658,735}

b) Deformabilidade Eritrocitária

Preparação / medição de amostras

A deformabilidade eritrocitária é expressa como o índice de alongamento (EI), em percentagem, e foi determinada para diferentes valores de tensão de cisalhamento (0,30; 0,60; 1,20; 3,00; 12,00; 30,00 e 60,00Pa) usando o difractómetro a *laser Rheodyn SSD da Myrenne (Roetgen, Alemanha)*.⁷³⁶

Estes valores mimetizam os valores de tensão de cisalhamento nos vasos sanguíneos em condições fisiológicas.

Este equipamento determina a deformabilidade simulando as tensões de cisalhamento exercidas pela corrente sanguínea e pela parede vascular nos eritrócitos. Para esse efeito, suspenderam-se 30 μ l de sangue em 2 mL de *Dextran* (um meio viscoso) e injectaram-se no dispositivo, para serem colocados entre um disco óptico rotativo e um disco estacionário, responsáveis por submeter os eritrócitos a tensões de cisalhamento precisas, forçando-os a deformar-se aos elipsóides. O grau de deformabilidade é avaliado por um feixe de *laser* que passa através da suspensão e é apresentado num computador. Quanto maior é o índice de balanço, maior é o grau de deformabilidade.⁷³⁷

Esta técnica simula o fluxo de fluido e as condições da parede do vaso, em que um feixe de *laser* é projectado através de uma suspensão de eritrócitos diluída e o padrão de difracção resultante analisado para determinar a forma do eritrócito e, portanto, um índice de deformação, também conhecido como índice de alongamento. A deformabilidade dos eritrócitos é avaliada de forma semi-quantitativa.⁶⁵⁸

Para as medidas de deformabilidade dos eritrócitos, o sangue total humano foi colhido para tubos com heparina e suspenso com tampão *Dextran* 40.000 em solução isotónica de NaCl (baixa viscosidade), em concentração final da suspensão de 1,5% (v/v).⁶⁵⁸

c) Viscosidade Total Sanguínea

Preparação / medição de amostras

A viscosidade do sangue total foi avaliada num viscosímetro digital *Brookfield* (*Brookfield*, EUA). Para tal foi utilizado sangue total colhido em tubo com heparina, submetido a baixas ($22,5 \text{ s}^{-1}$) e altas (225 s^{-1}) taxas de cisalhamento, tanto para um hematócrito nativo e após correcção do hematócrito de 45% e a 37°C . A viscosidade de um líquido depende da sua temperatura. A do sangue é geralmente medida a uma temperatura constante num viscosímetro rotacional, miliPascal.segundo (mPa.s). O sangue no sistema circulatório humano é afectado por elevadas variações na taxa de cisalhamento e as medidas de viscosidade podem ser variáveis de 6,0 a 8,0 mPa.s em baixa taxa de cisalhamento e de 4,4 a 5,2 mPa.s em alta taxa de cisalhamento.^{658,705}

Potencial Zeta da Superfície da Membrana dos Eritrócitos

Preparação / medição de amostras

O sangue humano foi colhido para um tubo com K_3EDTA e os eritrócitos foram isolados.⁶⁵⁸ O tampão BSGC com CaCl_2 , a pH 7,3, foi filtrado usando um filtro de seringa com tamanho de poro de $0,45 \mu\text{m}$ (*Whatman, Florham Park, NJ*) para remover partículas de tamanho maior, o que influenciaria as medições da dispersão da luz. A suspensão de eritrócitos foi ajustada para 0,035% de hematócrito em tampão BSGC com CaCl_2 (pH 7,3), na ausência ou na presença de diferentes concentrações de fibrinogénio (variantes humanas solúveis de 0,0-2,0 mg / mL).⁷³⁸

A análise do potencial zeta foi realizada conforme descrito por Carvalho *et al.* (2011).⁷⁰⁶ As medições foram conduzidas num equipamento de potencial zeta *Malvern Zetasizer Nano ZS* (Malvern, Reino Unido), equipado com um laser He-Ne ($\lambda = 632,8$ nm). O potencial zeta da superfície da membrana dos eritrócitos foi determinado, a 25°C, a partir da média de 15 medidas, com 60 corridas cada, com potencial aplicado de 30V, na ausência e presença de diferentes concentrações de fibrinogénio humano solúvel (0,4 a 2,0 mg / mL).^{658,706}

3.3.4. Análise Estatística

Caracterização Biofísica e Hemorreológica dos Eritrócitos na Esclerose Lateral Amiotrófica

Para cada parâmetro, neste estudo exploratório, os doentes de ELA foram comparados com o grupo controlo de indivíduos saudáveis, pelo teste *t-student* não emparelhado. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Para comparações múltiplas foi aplicada a correcção de *Bonferroni* ($p < 0,05/n$)

As análises estatísticas foram realizadas nos programas *SPSS Statistics 22®*, *MATLAB R2015A®* e *GraphPad Prism 5.03*.



RESULTADOS E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

“The only true wisdom is in knowing you know nothing.”

Socrates

4.1. IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES DE DISFUNÇÃO RESPIRATÓRIA NA ELA

4.1.1. Resultados e Discussão de Resultados da Quantificação da CC-16

Seguidamente estão descritos os resultados da quantificação da CC-16 em amostras de plasma de pacientes de ELA e controlos.

Os resultados estão resumidos na Tabela 11.

Tabela 11 | Resumo dos resultados da quantificação da CC-16 no plasma de pacientes com ELA e no grupo controlo

	Média Idades (anos)	Género (H/M)	Início: Medular Bulbar Respiratório	Duração média da doença (meses)	Média ALSFRS-R (variação)
Pacientes ELA n = 81	60,1 ±11,4 (28-83)	45/36	61/16/4 (M/B/R)	27,0±43,4 (4-335)	38,7±8,8 (11-46)
Controlos n = 30	53.7 ±7.7 (28-65)	17/13	-	-	-

	Média R-subscore (variação)	Média FVC % predito (variação)	Média PhrenAmpl (mV) (variação)	Média proteína CC-16 (ng/mL) (variação)
Pacientes ELA n = 81	11,29±1,1 (6-12)	84,6±24,2 (21-137)	0,54±0,22 (0,13-1,19)	10,56±6,84 (2,9-37,63)*
Controlos n = 30	-	-	-	8,34±3,10 (3,41-17,18)*

Abreviaturas da tabela: ELA| Esclerose Lateral Amiotrófica; H|Homens; M|Mulheres; ALSFRS-R| Escala de classificação funcional da esclerose lateral amiotrófica revista; FVC| Capacidade Vital Forçada; * $p=0,02$.

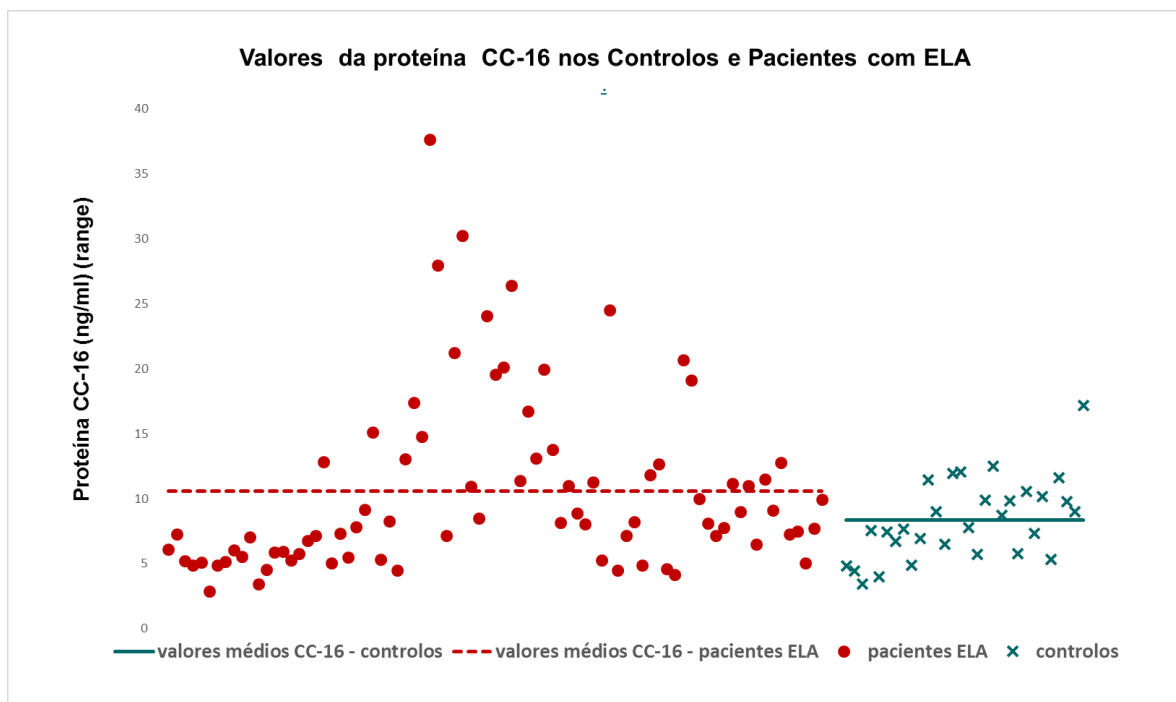


Figura 24 | Gráfico dos resultados. Distribuição dos valores plasmáticos de CC-16 após quantificação, por ELISA, de pacientes com ELA e de controlos.

O histograma dos resultados nas populações estudadas indicou uma distribuição normal, confirmada pelo teste de *Shapiro-Wilk* ($p > 0,05$). Nos controlos, a concentração média de CC-16 nas amostras de plasma foi de 8,34 ng/mL (SD = 3,10, intervalo 3,41-17,18). O limite superior do normal foi definido como 16,09 ng/mL (média +2,5 SD). Na população de pacientes com ELA, o valor médio de concentração de CC-16 foi de 10,56 ng/mL (SD=6,84, intervalo de 2,9-37,63), significativamente maior do que os valores de grupo controlo ($p=0,02$) (Figuras 24 e 25). Quatorze pacientes com ELA (17%) tinham uma concentração de CC-16 acima do valor limite superior definido.

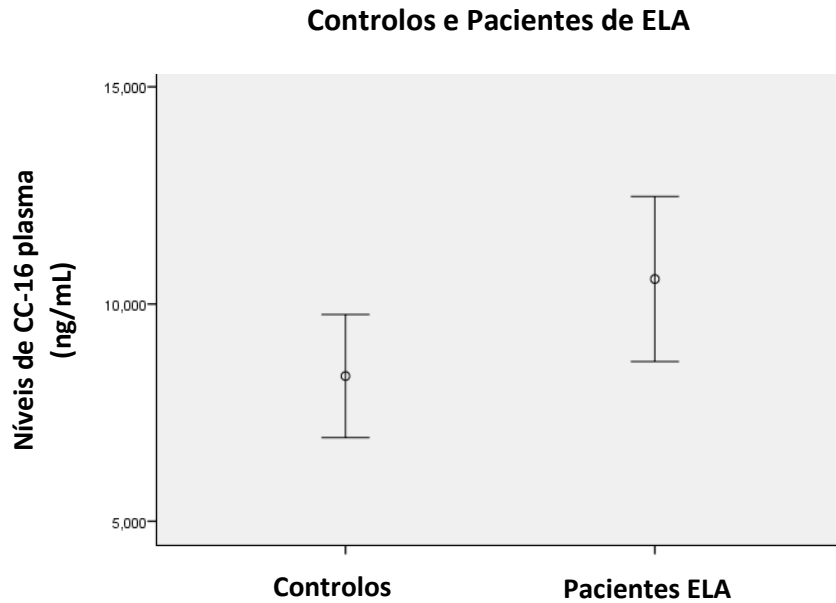


Figura 25| *Boxplot* dos dados de CC-16 obtidos para controlos e pacientes de ELA e respectivos valores mínimos e máximos (média $\pm 2,5$ SD).

Os níveis de CC-16 não se correlacionaram com a idade ($r=0,21$; $p=0,07$), duração da doença ($r=0,05$; $p=0,6$), ALSFRS-R ($r=0,09$; $p=0,5$), taxa de progressão da doença medida pelo declínio de ALSFRS-R/mês ($r=0,19$; $p=0,4$), *score*-R (respiratório) ($r = 0,12$; $p=0,3$), FVC ($r=0,19$; $p = 0,8$) e *PhrenAmpl* (amplitude de pico a pico das respostas motoras diafragmáticas por estimulação do nervo frénico, $r = 0,06$; $p = 0,6$). A duração média da doença foi semelhante no grupo de pacientes com valores elevados de CC-16 (média de 26 meses) e o grupo de pacientes com valor normais de CC-16 (média de 27 meses). Não houve diferença nos níveis de CC-16 entre pacientes com início medular e bulbar ($p=0,16$). No período de 6 meses após a inclusão no estudo, 7 dos 14 pacientes (50%) com nível de CC-16 anormal necessitaram de ventilação não-invasiva em comparação com 12 dos restantes 67 (17,9%), uma diferença significativa pelo método de *Kaplan-Meier* ($p = 0,01$) (Figura 26).

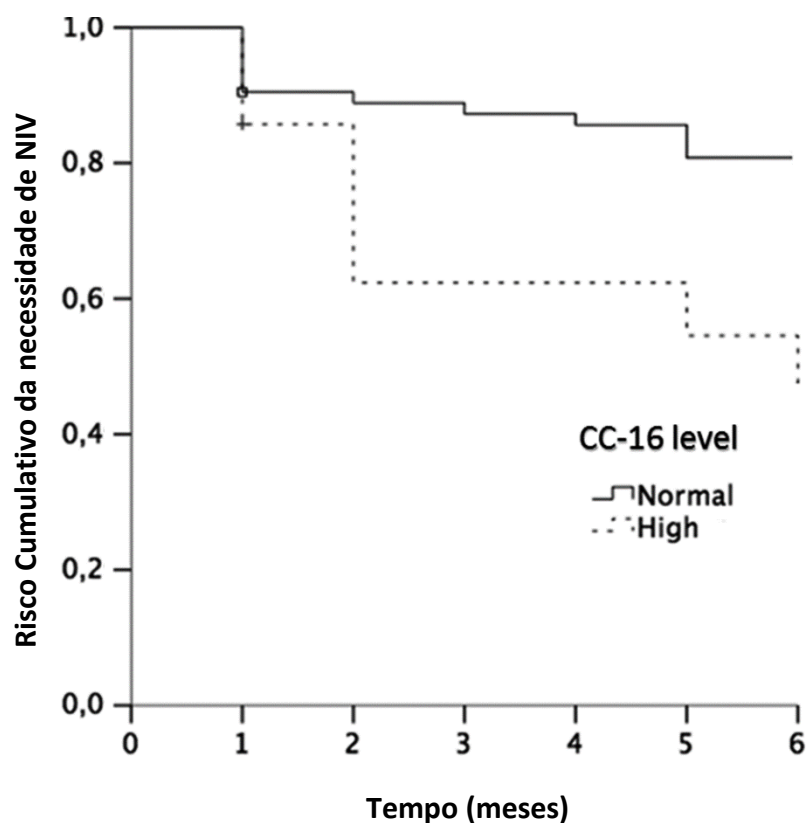


Figura 26| Gráfico de *Kaplan-Meier* demonstra que níveis elevados de CC-16 são um indicador prognóstico de exigência de ventilação não-invasiva nos 6 meses seguintes ($p=0,01$).

Neste período, em cada grupo morreram 2 pacientes, o que representa um risco 5 vezes maior nos pacientes com níveis elevados de CC-16.

Analisámos as curvas de sobrevida durante o período de 30 meses após a colheita de sangue. Neste período, 45 pacientes morreram. Em 28 (62%) destes, a morte ocorreu por broncopneumonia e/ou pneumonia por aspiração. Onze das 45 mortes ocorreram nos 14 pacientes com níveis elevados de CC-16 (79%). No grupo de 67 pacientes com valores de CC-16 normais, morreram 34 (51%) ($p=0,001$, teste *Qui-quadrado*). Nas curvas de sobrevida de *Kaplan-Meier*, não houve uma diferença significativa ($p=0,07$) indicando uma tendência para elevadas concentrações de CC-16 como um marcador de mau prognóstico para a sobrevida (Figura 27).

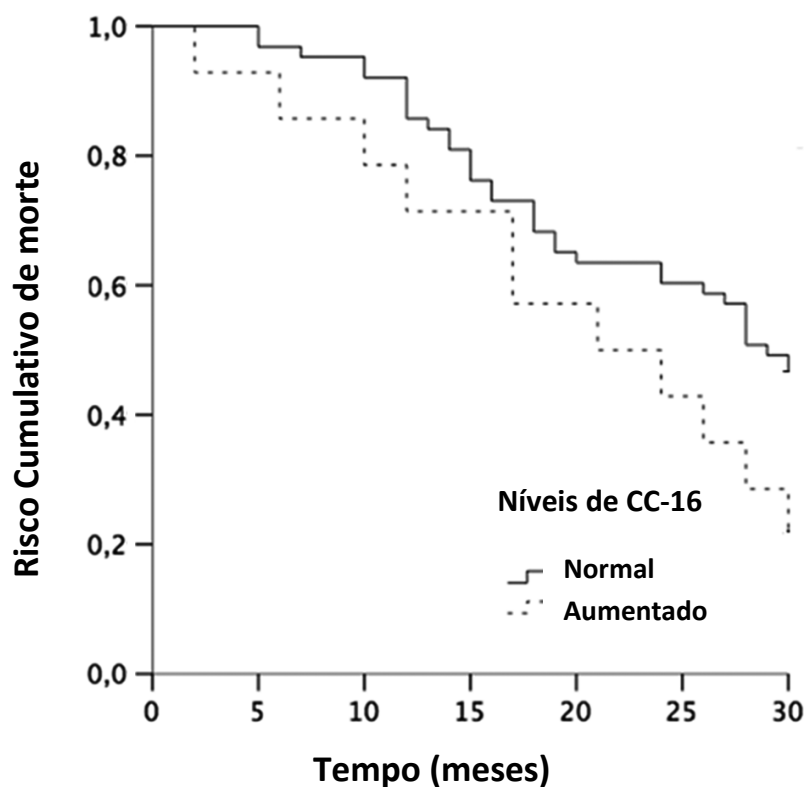


Figura 27 | Curvas de sobrevivência de acordo com a concentração de CC-16. Concentrações mais elevadas tendem a estar associadas a um mau prognóstico ($p = 0,07$).

A proteína CC-16 é uma pneumoproteína, é quantificável no plasma do sangue venoso e tem sido proposta a sua utilização como biomarcador para a disfunção pulmonar. O nível plasmático não é influenciado pela idade, género ou índice de massa corporal.^{631,632,739,740} No nosso estudo, os níveis de CC-16 no grupo controlo foram semelhantes aos valores referidos por outros grupos em indivíduos não fumadores saudáveis.^{631,632,739,740} Os níveis plasmáticos de CC-16 foram significativamente maiores nos pacientes com ELA, mas não encontramos correlação com género, idade, região de início, duração, capacidade funcional, taxa de declínio funcional, sintomas respiratórios, FVC e estudos electrofisiológicos da função do diafragma. No entanto, o subgrupo de pacientes de ELA com níveis anormais de CC-16 progrediu mais rapidamente, com maior probabilidade de necessitar de ventilação não-invasiva no período subsequente de 6 meses, com maior risco de mortalidade nesse mesmo período. Durante um acompanhamento mais longo, o número de óbitos foi suficiente para investigar o risco de sobrevivência com as estatísticas de *Kaplan-Meier*. Utilizando esse método, houve uma forte tendência, mas não significativa,

sugerindo que um nível aumentado de CC-16 pode ser um factor de mau prognóstico para a sobrevivência na ELA.

Os níveis de CC-16 no sangue de indivíduos saudáveis aumentam nas condições inflamatórias pulmonares,^{631,632,740} bem como na fase activa da fibrose pulmonar associada à esclerose sistémica.⁴⁶⁹

A neuroinflamação é um factor crítico na patogénese na ELA e muitos biomarcadores inflamatórios foram reconhecidos nesta doença.^{462,532,552,741} Em particular, a IL-6 encontra-se aumentada nos estadios tardios da doença.⁷⁴¹ Há evidências de que uma resposta inflamatória sistémica pode ser associada à inflamação no SNC em processos neurodegenerativos, possivelmente acelerando a progressão da doença.⁷⁴² Em estudos epidemiológicos, a insuficiência respiratória é a principal causa de morte na ELA.⁵⁸⁸ No entanto, o evento desencadeante mais comum para insuficiência respiratória na doença é a infecção pulmonar.^{728,743} Em comparação com pacientes com outras doenças neuromusculares que podem sobreviver com baixa função ventilatória,^{744,745} pacientes com ELA morrem frequentemente com volumes pulmonares voluntários razoáveis, sugerindo que o aumento da exigência metabólica de uma condição inflamatória concomitante pode descompensar a função respiratória. A explicação mais provável para os nossos resultados é que o distúrbio respiratório relacionado com a insuficiência respiratória iminente causou maior libertação de CC-16 no plasma. Este marcador de insuficiência respiratória não está relacionado com a força muscular respiratória conforme detectado por testes respiratórios convencionais. A inflamação intersticial pulmonar devido à microaspiração ou a pouca ventilação em algumas áreas pulmonares é uma causa de deterioração clínica na ELA¹²⁰ e, possivelmente, os níveis de CC-16 reflectem esse processo.⁷⁴⁶ Este teste pode, portanto, ter potencial utilidade como biomarcador de insuficiência ventilatória iminente na ELA.

4.1.2. Resultados e Discussão de Resultados da Quantificação da IL-6

Os resultados estão resumidos na Tabela 12.

Nos indivíduos controlo, não houve diferença nos níveis de IL-6 entre os géneros ($p = 0,8$). No entanto, houve uma correlação positiva entre a idade e os níveis de IL-6 ($r = 0,45$; $p=0,003$); 30% do aumento nos níveis de IL-6 nos controlos saudáveis foi dependente do aumento da idade. Nos pacientes com ELA, houve uma tendência para

o aumento dos níveis de IL-6 em comparação com controlos saudáveis, mas sem significância estatística (Tabela12; Figura 28).

Tabela 12| Análise descritiva dos valores da IL-6 plasmática para as diferentes variáveis nos diferentes subtipos da amostra.

	Média Níveis IL-6 (pg/mL) (SD)	M/F Razão	Média Idade (SD)	Média Duração doença (SD)	Forma de início (bulbar vs medular)	Média ALSFRS-R (SD)	Média valor predito FVC (SD)	Média da Phrenic ampl (SD)
Pacientes de ELA (n=82)	5,53 (12,94)	1,43	60,5 (9,9)	27,5 meses (43,7)	17/65	39,2 (7,7)	85,4 (22,9)	0,53 (0,22)
Controlos (n=43)	2,23 (1,61)	1,42	57,7 (8,9)	-	-	-	-	-
p value	0,1	0,9	0,22	-	-	-	-	-

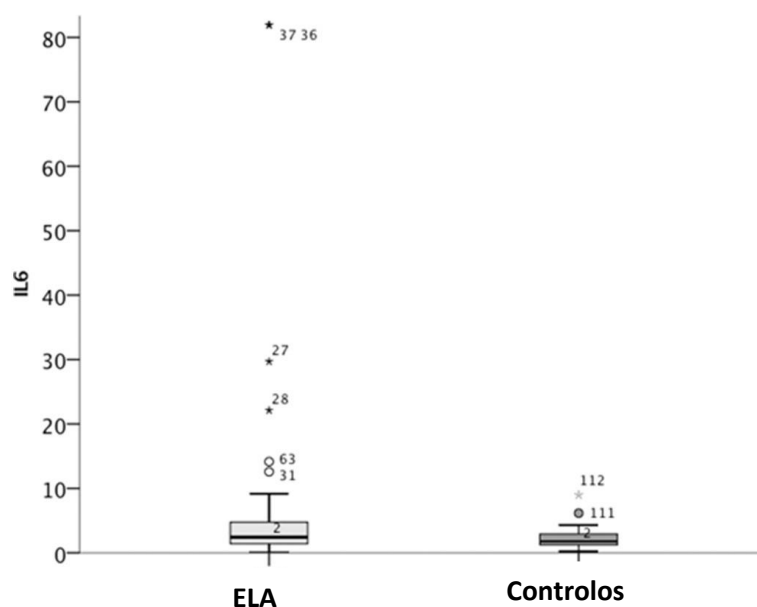


Figura 28| Comparação entre os níveis de IL-6 em controlos e pacientes com ELA. Observa-se uma tendência não significativa para maiores valores na população de ELA.

Nos pacientes com ELA, não houve diferença entre os valores de IL-6 no início bulbar (17 indivíduos, média de 2,90 pg/mL; SD=1,79) *versus* valores nos pacientes com início medular (65 indivíduos, média 2,13 pg/mL; SD=10,87) $p=0,33$ (Tabela 12).

Nos pacientes com ELA, os níveis plasmáticos de IL-6 não se correlacionaram com a duração da doença ($p=0,78$) nem com a escala funcional ALSFRS-R ($p=0,09$), mas

correlacionaram-se negativamente com a FVC ($r=0,35$; $p=0,04$) e com o *Phrenic Ampl* ($r=0,33$; $p=0,006$) e positivamente com a idade ($r=0,4$; $p < 0,001$). Recorrendo a um modelo de regressão múltipla, incluindo as variáveis género, idade, duração da doença, forma bulbar vs medular, ALSFRS-R, percentagem do valor predito do FVC e do valor médio da amplitude da resposta motora do nervo frénico, embora os dois últimos tivessem associação significativa com os níveis séricos da IL-6, apenas o parâmetro neurofisiológico revelou ser factor predictor independente ($p = 0,026$) (Figura 29).

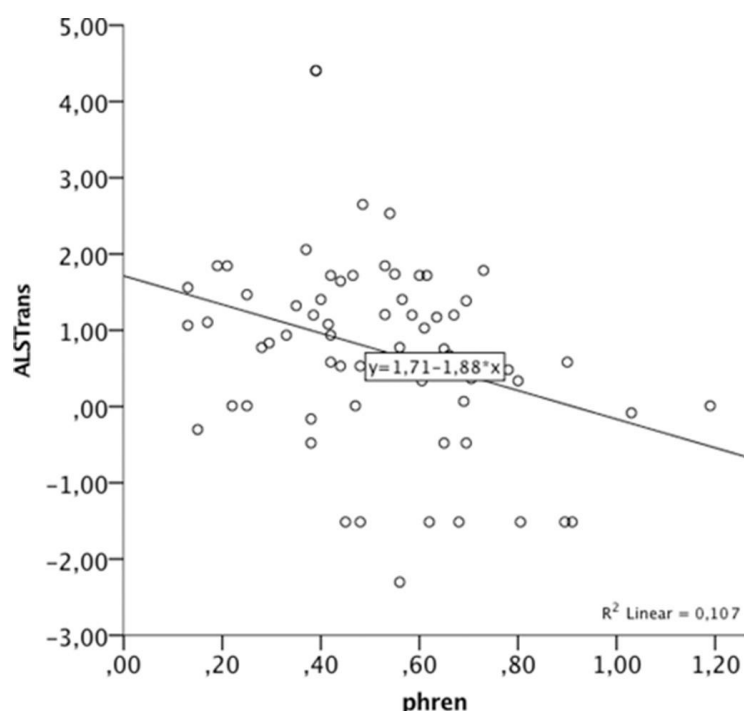


Figura 29 | Correlação entre o *Phrenic Ampl* e os níveis de IL-6.

Os valores de IL-6 foram *log*-transformados para normalizar os dados para análise de regressão.

Nesta população de ELA, o tempo de implementação do NIV foi registado em 77 dos 82 pacientes incluídos, sendo incerto nos 5 restantes. Dentro do intervalo de 6 meses, após a colheita de sangue, 33 pacientes necessitaram de NIV, mas 44 não receberam essa indicação médica. O valor médio plasmático de IL-6 foi de 8,93 pg/mL (SD = 2,17) no primeiro grupo e 2,17 pg/mL (SD=1,58) no último grupo ($p=0,001$), respectivamente. No grupo de 16 pacientes com valor de IL-6 acima do 3º interquartil (4,45pg/mL), o tempo para NIV foi inferior a 2 meses após a colheita da amostra em

9 pacientes e incerto em outros 2 pacientes; no restante o intervalo de tempo variou entre 4 meses (em 2) e 9 meses.

Vários biomarcadores inflamatórios aumentaram em pacientes com ELA, em particular as citocinas. Tal suporta o conceito de que as citocinas pró-inflamatórias desempenham um papel na patogénese ou progressão da ELA.⁷⁴⁷ Uma meta-análise recente demonstrou que os níveis de factor de necrose tumoral α (TNF- α), TNF 1, IL-6, interleucina-1 β , IL-8 e factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF) estavam significativamente aumentados em pacientes com ELA quando comparados com controlos.⁵³⁰ Foram identificados na ELA, através de estudos histológicos, níveis anormais de células inflamatórias e astrócitos activados e microglia de amostras da medula espinhal e tronco cerebral na ELA.⁵³² De facto, estudos de imagem PET revelaram uma activação microglial em pacientes com ELA.⁷⁴⁸

No entanto, a inflamação pode ter um papel neuroprotector através do envolvimento do sistema imunitário T-regulatório (*Treg*)/Th2, conduzindo a respostas neuroprotectoras anti-inflamatórias que bloqueiam mediadores pró-inflamatórios nocivos.^{749,750} A taxa de progressão na ELA parece ser modulada pela actividade *Treg* endógena.^{751,752} Níveis elevados de citocinas podem favorecer a progressão da doença ou a neuroprotecção, dependendo de uma interacção complexa entre as células imunitárias e os seus mediadores. Em particular, a IL-6 é uma citocina bifuncional, actuando como um mediador pró-inflamatório⁷⁵³ e uma citocina anti-inflamatória.⁷⁵⁴ Tem sido sugerido que o aumento da libertação de IL-6 poderia representar uma reacção neuroprotectora contra o dano excitotóxico, como observado num modelo animal experimental com ELA.⁷⁵⁵ A IL-6 tem uma acção complexa no metabolismo celular. Promove captação de glicose e oxidação de ácidos gordos⁷⁵⁶ e o aumento da libertação de IL-6 pode induzir desequilíbrio hipermetabólico, como está associado à ELA.⁶⁶ O metabolismo da IL-6 é de interesse actual como um factor na ELA. Esta citocina foi recentemente proposta como alvo terapêutico, conduzindo a um estudo multicêntrico, aleatorizado, *double-blind*, controlado por placebo, de 16 semanas, avaliando a segurança e tolerabilidade do Tocilizumab em indivíduos com ELA, um estudo que foi concluído em julho de 2018.⁷⁵⁷ Encontramos um aumento no nível plasmático de IL-6 em função da idade, um resultado em concordância com Ershler,⁷⁵⁸ mas esse resultado não é universal.⁷⁵⁹ Como há uma variação diurna nos níveis de IL-6,⁷⁶⁰ todas as nossas amostras de sangue foram colhidas pela manhã, mas não está claro se essa precaução foi considerada por todos os outros

investigadores. Os níveis de IL-6 nos nossos pacientes com ELA foram marcadamente variáveis (Tabela 12) e o valor médio não alcançou significância estatística no nosso estudo, como igualmente demonstrado numa meta-análise de Hu *et al* (2017).⁵³⁰ Um outro factor provavelmente relacionado é a hipoxémia e a inflamação pulmonar associada. Nos nossos pacientes, houve uma correlação com *Phrenic Ampl*, sugerindo que esse resultado era importante. No entanto, não temos estudos de saturação de oxigénio de 24 horas para resolver definitivamente esse problema. Em resumo, o significado dos níveis elevados de IL-6 na ELA é actualmente incerto.

Concluimos que a IL-6 deve ser explorada como um marcador de insuficiência respiratória na ELA.

4.1.3. Resultados e Discussão de Resultados do Estudo da Creatinina

A amostra integrou 233 pacientes com ELA, dos quais 131 do género masculino (56,2%), 156 com início medular (66,9%), 62 (26,6%) com início bulbar e os restantes com início axial, respiratório ou difuso. (Tabela 13)

Tabela 13 | Características demográficas dos doentes da amostra, relativamente ao género, fenótipo e presença de demência fronto-temporal (FTD).

Amostra n=233		Número de pacientes	
		n	%
Género	Masculino	131	56,22
	Feminino	102	43,77
Fenótipo	Medular	156	66,95
	Bulbar	62	26,61
	Outro: Respiratório, axial ou difuso	15	6,44
Presença de FTD	-	19	18,65

Da análise descritiva das variáveis, podemos observar que na população, a idade média do diagnóstico foi de 62,8 anos (SD= 12,2) e a duração média da doença na consulta inicial de 18,65 meses (SD= 21,32). (Tabela 14)

Tabela 14| Análise descritiva das variáveis: idade de diagnóstico (anos) e duração da doença na consulta inicial (meses).

Amostra n=233	Média	Desvio Padrão	Mediana	Valor Mínimo	Valor Máximo
Idade de Diagnóstico (Anos)	62,82	12,23	63,93	15,40	89,60
Duração da doença na consulta inicial (Meses)	8,65	21,33	13,07	0,13	180,80

As tabelas 15 e 16, incluem os valores das avaliações efectuadas aquando da primeira consulta, o valor médio da creatinina plasmática, na nossa população foi 0,78 mg/dL (SD=0,28), sendo 0,85 mg/dL (SD=0,19) nos homens e de 0,69 mg/dL (SD=0,21) nas mulheres. Cerca de 43% dos pacientes apresentavam um valor de FVC inferior a 80%.

Tabela 15| Análise descritiva das várias avaliações na primeira consulta, *t1*.

Avaliações na primeira consulta, <i>t1</i> (n=233)	Média	Desvio padrão	Mediana	Valor Mínimo	Valor Máximo
Creatinina plasmática (mg/dL)	0,78	0,28	0,76	0,15	1,7
IMC (Kg/m²)	24,85	3,67	24,52	15,06	38,82
1.º %FVC (%)	81,85	23,41	86	16	139
1.ª ALSFRS-R Score Global (0-48)	42,90	6,66	45	15	51
1.º ALSFR-R subscore Respiratório (0-12)	11,24	1,35	12	5	12

Legenda da tabela: Creatinina plasmática (mg/dL); Índice de massa corporal (IMC, Kg/m²); Percentagem da capacidade vital forçada obtida em relação ao valor predito (%FVC); Pontuação da Escala Funcional da ELA Revista (ALSFRS-R *global score*) e *subscore* respiratório (ALSFR-R respiratory *subscore*).

Os valores foram semelhantes nos doentes com início medular e bulbar, respectivamente, 0,79 mg/dL (SD=0,2) e de 0,78 mg/dL (SD=0,21).

Valores inferiores ao intervalo de referência foram identificados em 34 doentes (14,6%). Observou-se que 13 pacientes deste sub-grupo (38%) apresentavam um FVC inferior a 80% do previsto.

Tabela 16| Análise descritiva das várias variáveis, na primeira consulta (t1), de pacientes com valores de creatinina inferiores ao limite inferior determinado pelo laboratório.

Avaliações na primeira consulta, t1 n=34	Média	Desvio padrão	Mediana	Valor Mínimo	Valor Máximo
Creatinina plasmática (mg/dL)	0,55	0,12	0,60	0,15	0,78
IMC (Kg/m²)	24,71	2,98	24,40	20,11	30,87
1.º %FVC (%)	85,05	21	90,31	28,00	127,30
1.ª ALSFRS-R Score Global (0-48)	44	5,97	45,50	22,00	51,00
1.º ALSFR-R subscore Respiratório (0-12)	11,24	1,46	12,00	6,00	12,00

Legenda da tabela: Creatinina plasmática (mg/dL); Índice de massa corporal (IMC, Kg/m²); Percentagem da capacidade vital forçada obtida em relação ao valor predito (%FVC); pontuação da Escala Funcional ELA Revista (*ALSFRS-R global score*) e subpontuação respiratória (*ALSFR-R respiratory subscore*).

No momento da análise dos dados, apenas 38,6% dos doentes estavam a ser seguidos, 54,1% (n=126) tinham morrido e 7,3% (n=17) deixaram de comparecer na consulta.

Na tabela 17, está representada a influência das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes, na primeira consulta, t1, expresso sob a forma de um coeficiente de regressão.

O valor da creatinina na primeira consulta foi preditivo do valor inicial de ALSFRS-R ($p=0,014$), mas não foi possível estabelecer uma relação independente entre a creatinina e o ALSFRS-R_{Resp.} ($p>0,6$) e o FVC ($p>0,1$). A interacção entre o valor de creatinina e o score ALSFRS-R não foi influenciado pelo género. Adicionalmente observámos que a idade foi factor preditivo negativo do ALSFRS-R ($p<0,001$), ALSFRS-R_{Resp.} ($p=0,012$) e FVC ($p=0,002$) e a duração doença do ALSFRS-R global ($p=0,018$). O início bulbar foi preditivo do valor inicial de FVC ($p=0,002$). Não foi

possível estabelecer uma relação entre as restantes variáveis independentes com o ALSFRS-R, ALSFRS-R_{resp} e FVC.

Tabela 17 | A tabela representa a influência das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes, na primeira consulta, *t1*, expresso sob a forma de um coeficiente de regressão.

		VARIÁVEIS INDEPENDENTES								
		Idade no diagnóstico	Duração dos sintomas até ao diagnóstico	Fenótipo bulbar	Fenótipo não bulbar	IMC	Género	FTD	Cr	
VARIÁVEIS DEPENDENTES	ALSFRS-R n-182	-0,322**	-0,181*	0,011	0,036	-0,111	0,001	0,019	0,186*	
	ALSFRS-R _{resp} n-182	-0,345*	-0,129	-0,009	-0,06	-0,026	0,050	0,029	0,017	
	%FVC n-152	-0,348*	-0,129	0,095*	-0,06	-0,026	0,049	0,029	0,167	

Legenda da tabela: Coeficientes positivos (negativos, respectivamente) indicam que valores elevados das variáveis independentes estão associados a valores elevados (diminuídos, respectivamente) das variáveis dependentes. (n) representa o número de doentes analisados em cada regressão. Os * indicam o nível de significância dos coeficientes, com * e ** a representarem *p-values* inferiores a 0,05 e 0,001, respectivamente. Os coeficientes que sobrevivem à correção de *Bonferroni* estão representados a *bold*.

Índice de massa corporal (IMC); Demência fronto-temporal (FTD); Creatinina (Cr); Percentagem da capacidade vital forçada obtida em relação ao valor predito (%FVC); Pontuação na Escala Funcional ELA Revista (ALSFRS-R global score) e *subscore* respiratório (ALSFR-R_{resp} *subscore*).

Na tabela 18, está representada a influência das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes, até uma terceira avaliação longitudinal, expresso sob a forma de um coeficiente de regressão.

Efectuando uma análise longitudinal, que compreende uma primeira avaliação na admissão e duas avaliações subsequentes, no decurso da doença, o valor inicial da creatinina foi preditor do declínio do ALSFRS-R ($p < 0,001$). No entanto, não foi possível estabelecer o valor preditor da creatinina inicial para o declínio do *subscore* ALSFR-R_{resp} ($p > 0,09$) e para o FVC ($p > 0,5$). A idade foi preditora do declínio do ALSFRS-R ($p < 0,001$) e do FVC ($p < 0,001$), mas sem influência no ALSFRS-R_{resp} ($p = 0,02$, não sobrevive à correção de *Bonferroni*). O início não-bulbar foi preditor do declínio do

FVC ($p<0,001$) e está associado a um declínio mais lento do ALSFRS-R_{resp} ($p<0,001$), mas sem impacto no ALSFRS-R ($p=0,7$). Não foi possível estabelecer uma relação entre as restantes variáveis independentes com o declínio do ALSFRS-R, ALSFRS-R_{resp} e do FVC.

Tabela 18 | Avaliação longitudinal da influência das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes, até uma terceira avaliação, no decurso da doença, expresso sob a forma de um coeficiente de regressão.

		VARIÁVEIS INDEPENDENTES								
		Idade no diagnóstico	Duração dos sintomas até ao diagnóstico	Fenótipo bulbar	Fenótipo não bulbar	IMC	Género	FTD	Cr	Tempo
VARIÁVEIS DEPENDENTES	ALSFRS-R n-154	-0,237**	0,024	-0,021	-0,001	-0,67	-0,008	0,040	0,193*	-0,536
	ALSFRS-R _{Resp} n-154	-0,125*	0,019	-0,036*	0,126**	0,017	0,026	0,034	0,093	-0,030
	%FVC n-56	-0,034**	0,819	-0,145	-0,21**	0,034	-0,233	0,005	0,020	0,011

Legenda da tabela: Coeficientes positivos (negativos, respectivamente) indicam que valores elevados das variáveis independentes, estão associados a valores elevados (diminuídos, respectivamente) das variáveis dependentes. (n) representa o número de doentes analisados em cada regressão. Os * indicam o nível de significância dos coeficientes, com *, **, representarem *p-values* inferiores a 0,05 e 0,001, respectivamente. Os coeficientes que sobrevivem à correção de *Bonferroni* estão representados a *bold*.

Índice de massa corporal (IMC); Demência fronto-temporal (FTD); Creatinina (Cr); Percentagem da capacidade vital forçada obtida em relação ao valor predito (%FVC); Pontuação na Escala Funcional ELA Revista (ALSFRS-R *global score*) e subpontuação respiratória (ALSFR-R_{resp} *subscore*).

Ao efectuar a regressão de risco proporcional de Cox, identificamos que apenas o fenótipo bulbar (*Hazard Ratio* (HR) 1,56; $p=0,029$; intervalo de confiança (IC) 95% [1,05;2,34]) e a idade do diagnóstico (HR =16,41; $p<0,0001$; IC95% [3,8;70,78]) estão associados a um aumento da mortalidade. Nesta análise, as outras variáveis independentes, nomeadamente a creatinina, não se relacionam com a sobrevivência.

Na Tabela 19, está representada a análise da mortalidade dos pacientes da amostra, através da regressão de Cox, tendo em conta a influência das várias co-variáveis (preditoras de sobrevida).

Tabela 19| Representação da análise da mortalidade dos pacientes da amostra, através da regressão de Cox, tendo em conta a influência das várias co-variáveis (preditoras de sobrevida).

CO-VARIÁVEIS		B	Wald	p-value	HR (ExpB)	IC 95,0%	
						Min.	Max.
CO-VARIÁVEIS	Idade de Diagnóstico	2,80	14,07	< 0,0001	16,406	3,80	70,78
	Duração sintomas até ao diagnóstico	-2,10	2,69	0,101	0,122	0,01	1,51
	Género	-0,09	0,16	0,690	0,916	0,60	1,41
	FTD	-0,23	0,47	0,492	0,792	0,41	1,54
	Fenótipo Bulbar	0,45	4,785	0,029	1,564	1,05	2,34
	Fenótipo não bulbar	-0,45	1,293	0,255	0,636	0,29	1,39
	IMC _{adm}	-1,40	2,247	0,134	0,246	0,04	1,54
	Cr	-0,80	0,91	0,339	0,448	0,09	2,32

Legenda da tabela: Coeficientes de regressão (B) positivos indicam que valores elevados das respectivas variáveis estão associados a razões de risco (*Hazard Ratio*, HR) elevados. Preditores de sobrevida com $HR > 1$ estão associados a um pior prognóstico. Nível de significância, $\alpha = 0,05$. Apenas o fenótipo bulbar e a idade de diagnóstico, estão associados, a uma redução da sobrevida dos pacientes. Demência fronto-temporal (FTD); Índice de massa corporal na admissão (IMC adm); Creatinina (Cr) *Hazard Ratio* (HR); Intervalo de confiança (IC).

No estudo da mortalidade, foram incluídos 135 pacientes ($n=135$). Os restantes pacientes foram censurados, uma vez que o evento “morte” não ocorreu até ao ponto de corte, ou cujo seguimento, em consulta, se perdeu. Recorrendo à técnica de *Median-Split*, a sobrevida não foi diferente entre os subgrupos com valor de creatinina superior vs inferior à mediana (0,76mg/dL), ($p=0,383$). No ponto de corte (60 meses após o diagnóstico), apenas 8% dos pacientes com valores de creatinina inferiores à mediana e 10% dos pacientes com valores de creatinina superiores à mediana permanecem vivos, (Figura 30). Ao fim de 29 meses e 31 meses após o diagnóstico,

apenas metade dos pacientes estavam vivos, nos grupos com valores de creatinina inferior e superior á mediana, respectivamente, (Figura 30).

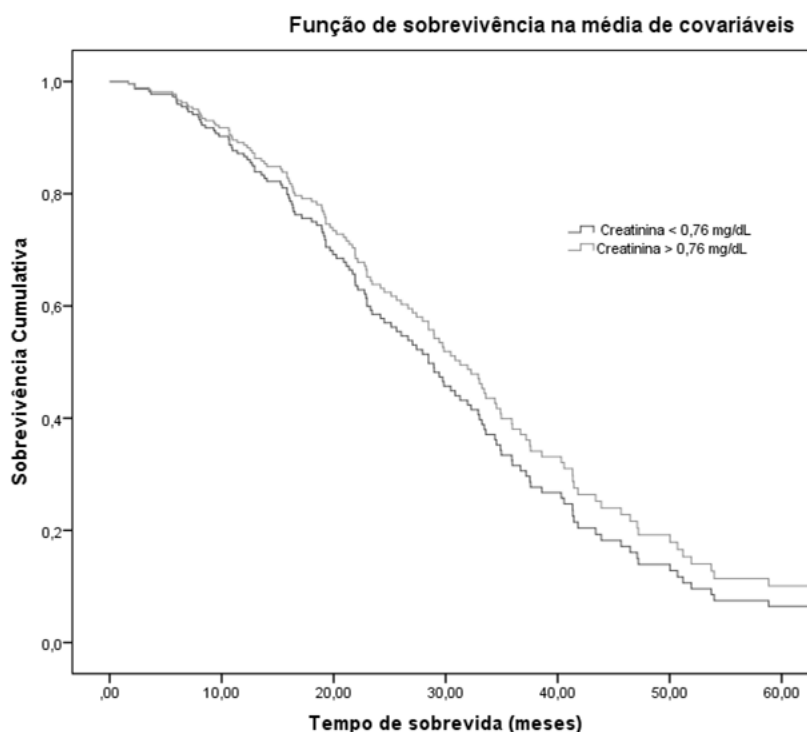


Figura 30 Representação gráfica da curva de sobrevivida obtida pela regressão Cox com base na média das co-variáveis (preditoras de sobrevivida). Comparando grupos de pacientes com valores de creatinina na primeira consulta, superiores e inferiores à mediana (0,76mg/dL), ($p=0,383$).

A amostra estudada no presente estudo tinha as características demográficas representativas do universo de pacientes com ELA.^{2,73,76,761} Na admissão, 14,6%, apenas, dos pacientes de ELA apresentaram valores de creatinina inferiores ao limite inferior do intervalo de referência. Tais resultados podem ser explicados pelo facto de grande parte dos pacientes ainda não apresentarem uma marcada atrofia muscular generalizada. De acordo com a literatura, a creatinina sérica decai a um ritmo constante e o declínio está intimamente ligado à atrofia muscular.^{33,504,542} No entanto, não podemos excluir, neste grupo de pacientes, que vários fármacos podem ter condicionado um aumento da creatinina sérica, tal como reportado, nomeadamente o uso de anti-inflamatórios não-esteróides, corticosteróides, salicilatos entre outros.^{762,763}

Vários estudos têm sido efectuados com a preocupação de compensar a variabilidade que possa existir na quantificação da creatinina, nomeadamente, utilizando a razão creatinina/cistatina C como indicador do declínio muscular. Uma vez que a cistatina C (inibidor das cisteínoproteases) é uma proteína de baixo peso molecular produzida por todas as células, cuja concentração depende exclusivamente da taxa de filtração glomerular, a razão atenuaria a influência desta taxa por forma a obtermos um indicador exclusivo da reserva muscular.^{764,765}

De acordo com os nossos resultados, e após a respectiva análise estatística, não foi possível estabelecer o valor da creatinina plasmática, obtida na avaliação inicial da primeira consulta, como preditora da função respiratória (FVC), o nosso principal objectivo, nem com a sobrevida. No entanto, confirmamos que a creatinina é um factor preditivo independente da capacidade funcional e da sua progressão, através da escala funcional ALSFRS-R. O ALSFRS-R contém vários elementos que avaliam de forma subjectiva a acção de vários músculos esqueléticos (tais como a capacidade de marcha, nos cuidados pessoais ou da mobilidade na cama). Desta forma, a atrofia destes músculos, traduz-se qualitativamente numa menor pontuação de avaliação da capacidade funcional e quantitativamente num menor valor de creatinina.³³ No nosso estudo, foi confirmada a idade no diagnóstico como factor preditor do declínio da capacidade funcional (ALSFRS-R) e da função respiratória (FVC), no momento da primeira consulta e em termos de progressão clínica, tal como descrito na literatura.^{76,381,766} Do mesmo modo, observámos, que no momento da primeira consulta, o fenótipo bulbar se associou a uma menor % de FVC. Contrariamente ao expectável,^{74,381,767} não foi possível demonstrar a influência do IMC na progressão da doença.

Este estudo apresenta várias limitações, nomeadamente, o reduzido número de doentes da amostra; alguns dados incompletos; a limitação a três avaliações longitudinais; a variabilidade entre laboratórios onde ocorreu a quantificação da creatinina, a inexistência de um registo de factores que podiam ter sobrevalorizado os valores de creatinina.

O FVC e o ALSFRS-R são preditores de prognóstico validados e universalmente utilizados para avaliação de pacientes de ELA, no entanto, apresentam várias limitações. O FVC tem uma sensibilidade diminuída quando avalia pacientes com um envolvimento respiratório moderado ou quando apresentam um fenótipo bulbar. Os

pacientes com fraqueza muscular diafragmática podem ter os FVC sobrevalorizados, pela não realização da espirometria na posição supina e pela acção dos músculos acessórios.^{586,768} Relativamente ao ALSFRS-R, a sua avaliação pode ser subjectiva e não é sensível a pequenas alterações da capacidade funcional.⁷⁶⁹ Devido às limitações dos factores de prognóstico demográficos e clínicos, o desenvolvimento de novos biomarcadores é fundamental para complementar os estudos de sobrevida na ELA.^{214,770,771}

Os biomarcadores laboratoriais de prognóstico deverão ser validados quanto à sua reprodutibilidade, especificidade e sensibilidade. São promissores, uma vez que podem ser informativos de uma forma fácil, rápida e sem riscos para os pacientes.^{33,377} A creatinina plasmática destaca-se por ser um factor preditivo da progressão funcional da doença, no entanto, será necessário uma investigação mais intensa, de forma a explorar o potencial papel preditor da função respiratória numa população mais ampla de pacientes.³³

4.1.4. Resultados e Discussão de Resultados da Quantificação do Fibrinogénio *Gamma* (γ')

Foram incluídos prospectivamente 69 pacientes consecutivos com ELA seguidos no nosso centro. No mesmo período e usando a mesma metodologia, estudámos 82 indivíduos saudáveis como grupo controlo. A amostra de pacientes de ELA foi constituída por 40 homens (57,97%) e 29 mulheres (42,03%), com idade média 65,84 anos (SD=10,74) e duração média da doença de 23,03 meses (SD=20,45). A população de controlos foi constituída por 46 homens (56,10%) e 36 mulheres (43,90%) com idade média de 46,94 (SD=11,63).

O valor médio das idades foi significativamente diferente entre grupos $p < 0,0001$ (entre grupos). Os níveis de fibrinogénio γ' plasmático foram significativamente mais elevados no grupo de ELA ($50,73 \pm 2,968$ mg/dL) do que no grupo dos controlos ($38,66 \pm 1,838$ mg/dL), $p=0.0006$ (Figura 31). No grupo de doentes não foi observada diferença estatística entre sexos, homens 49,26 mg/dL (SD= 4,308) e mulheres 52,74 mg/dL (SD=3,872), $p = 0,5663$.

Aplicando um modelo de regressão múltipla com as co-variáveis sexo, forma de início bulbar *versus* medular e idade, verificámos que os níveis de fibrinogénio γ' plasmático no grupo de ELA não é dependente daquelas variáveis.

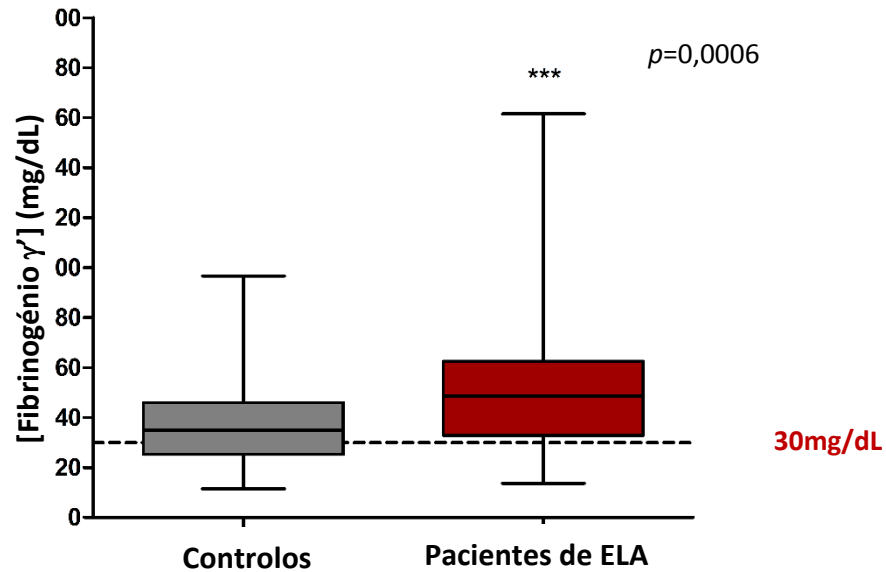


Figura 31| Gráfico comparativo entre grupos dos níveis plasmáticos do fibrinogénio γ' . Os valores de fibrinogénio γ' nas amostras dos pacientes com ELA foram superiores aos dos controlos, (n=69 e controlos n=82), *** $p=0,0006$.

O modelo de Cox, com ponto de corte nos 60 meses após o diagnóstico, com a inclusão das co-variáveis envolvidas como preditoras da sobrevida (forma de início da doença, sexo; idade, e presença de demência) e com a inclusão dos valores de fibrinogénio γ' acima vs abaixo da mediana, mostrou que apenas a idade foi determinante da sobrevida ($p=0,033$).

Aplicando um modelo de regressão múltipla e considerando a avaliação do score funcional ALSFRS-R, quer o valor inicial como a sua progressão nas duas consultas subsequentes, com intervalo de cerca de 3-4 meses entre consultas, o valor do fibrinogénio γ' não foi preditor da perda funcional total, ou respiratória (avaliada pelo subscore respiratório da escala), $p=0,26$. Neste modelo, incluindo a forma de início da doença, o sexo e a idade, apenas esta última foi determinante do declínio funcional da escala ALSFRS-R global ($p=0,049$) e nenhuma co-variável foi preditora do declínio do subscore respiratório.

Tal como realizado para o score funcional ALSFRS-R, estudámos através de modelo de regressão múltipla, o fibrinogénio γ' como preditor do declínio de FVC. Este marcador não foi preditor do declínio da função respiratória, avaliada pelo %FVC ($p=0,40$).

Estudos populacionais, demonstraram que os níveis de fibrinogénio total plasmático, são influenciados pela idade ^{772,773} e valores elevados de fibrinogénio foram reportados em mulheres na faixa etária mais jovem e mais idosa, o mesmo foi reportado para os homens.⁷⁷² Por outro lado, os níveis de fibrinogénio γ' tendem a ser mais elevados nas mulheres e a estar directamente correlacionados com o IMC, resistência à insulina, glicémia e níveis de triglicéridos; mas inversamente influenciados pela actividade física e colesterol HDL.^{41,774,775} Mas no presente estudo as variáveis género e idade não foram factores que influenciaram os resultados na população de doentes.

Os resultados indicam níveis mais elevados no plasma de fibrinogénio γ' na população de ELA, provavelmente em associação com o processo neuroinflamatório, pois esta molécula tem sido associada a um aumento de fenómenos tromboembólicos e à inflamação. As funções pró-inflamatórias da fibrina(io) e seus péptidos derivados, estão associados à sua capacidade de se ligar e activar uma ampla variedade de células imunitárias, através de distintas interacções ligando-receptor. Estas funções pró-inflamatórias são um produto de sinalização do fibrinogénio através de sítios de ligação que não são sobrepostos com aqueles envolvidos na cascata de coagulação. O receptor da integrina CD11b/CD18 (também denominado *Mac-1*, complemento de receptor 3, ou $\alpha M\beta 2$) ⁷⁷⁶ é um exemplo representativo. Este receptor é expresso pelos leucócitos do sistema imunitário inato, principalmente nos monócitos circulantes, macrófagos específicos do tecido e sistema nervoso central (SNC), residentes na microglia. Vários estudos identificaram múltiplas regiões da molécula de fibrinogénio com afinidade de ligação a este receptor, como as regiões do terminal C do fibrinogénio β e cadeia γ .⁷⁷⁶ Este receptor de integrina, que tem um receptor para o fibrinogénio, desencadeia um efeito pró-inflamatório, activando uma cascata de acontecimentos que passa pela activação da microglia em doenças do SNC como a esclerose múltipla ou doença de Alzheimer.^{777,778} Níveis anormais de fibrinogénio γ' podem estar associados ao maior risco de eventos trombóticos descritos na ELA.

O nível do fibrinogénio γ' não foi preditor da sobrevida ou da perda funcional, pelo que o significado do seu aumento plasmático em doentes de ELA não fica esclarecido. Uma limitação deste estudo prende-se com o facto de não ter sido quantificado o fibrinogénio total em todas as amostras dos pacientes estudados. Seria importante

calcular a razão entre os valores de fibrinogénio total e o fibrinogénio γ' , de modo a conseguir dissecar os resultados.

No futuro, o estudo de uma população maior de doentes permitirá aferir a relevância deste biomarcador na monitorização do prognóstico e na função respiratória dos doentes com ELA.

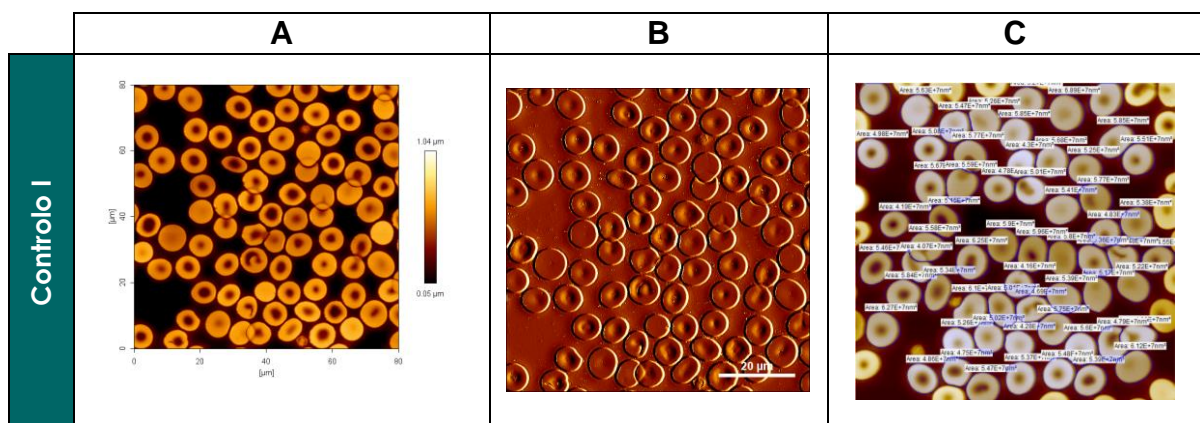
4.2. CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA, MORFOLÓGICA E HEMORREOLÓGICA DOS ERITRÓCITOS NA ELA

Estudámos prospectivamente amostras de 23 pacientes consecutivos com ELA seguidos no nosso centro. No mesmo período, e usando a mesma metodologia, estudámos 17 controlos saudáveis. A amostra de pacientes com ELA foi constituída por 13 homens (56,52%) e 10 mulheres (43,48 %), com idade média de 65,8 anos (SD=9,86) e a duração média de doença 38,3 meses (SD=58,7). A amostra de controlos foi constituída por 8 homens e 9 mulheres, com idade média de 44,5 anos (SD=13,59). Os dois grupos diferiram significativamente relativamente à idade $p<0,0001$.

4.2.1. Microscopia de Força Atómica (AFM) - Morfologia e Propriedades da Membrana Eritrocitária

Pela AFM dos eritrócitos de pacientes com ELA, foi possível avaliar sua morfologia e compará-la com o grupo controlo (Tabela 20, Figura 32). Na Figura 36, podem ser visualizados exemplos de imagens de AFM obtidas de eritrócitos de pacientes com ELA e de controlos.

a) Imagens de AFM de Controlos e Pacientes de ELA



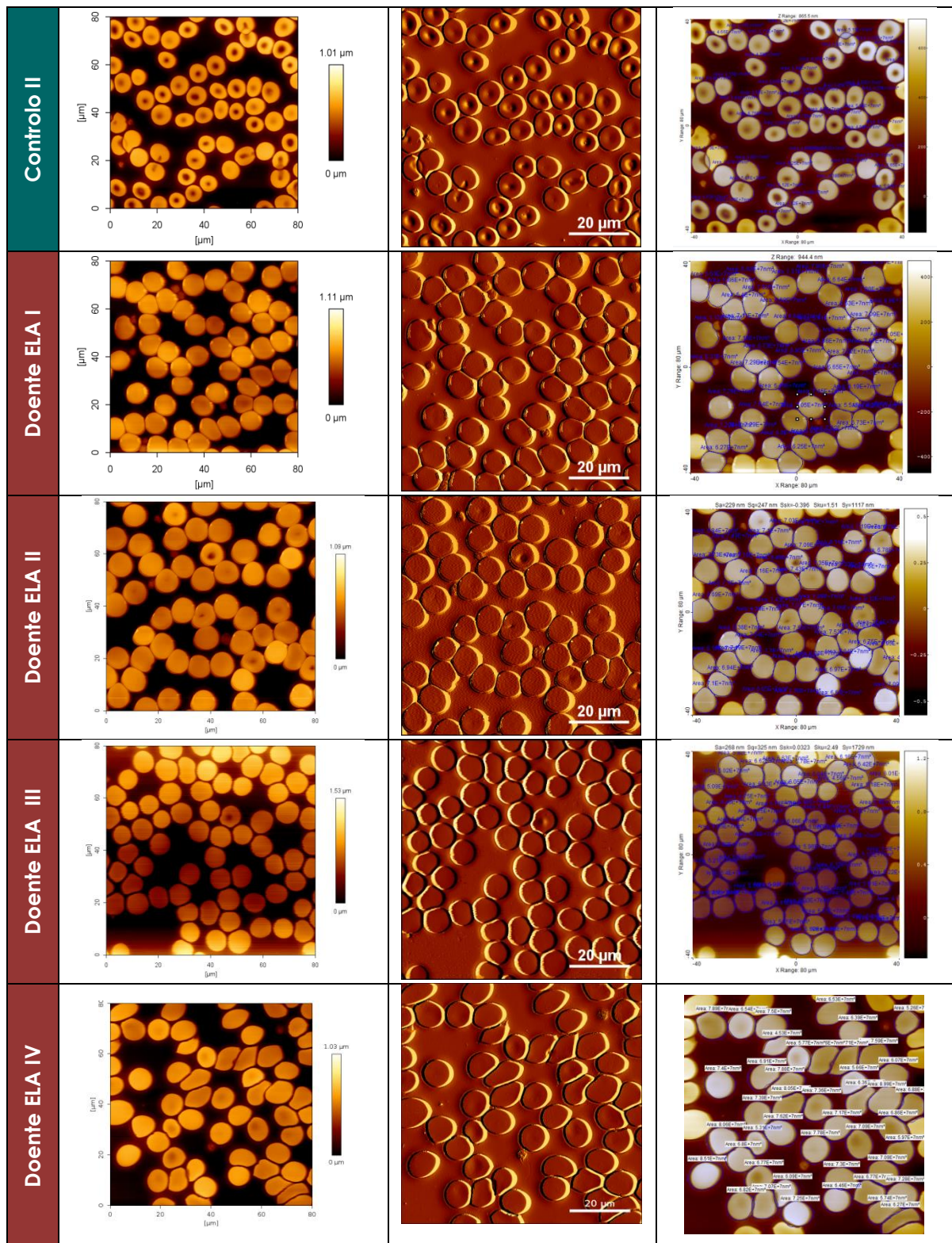


Figura 32] Propriedades morfológicas dos eritrócitos, medidas por microscopia de força atômica em pacientes de ELA e controlos.

Coluna A: Imagem da altura da AFM com escala de cores relativa (80 μm \times 80 μm). Coluna B: a respectiva imagem do sinal de erro do Z scanner em AFM. Coluna C: exemplos da análise morfológica dos eritrócitos feita usando o software específico *software* SPIP™, (*Image Metrology, Inc.*).

Tabela 20 | Propriedades morfológicas dos eritrócitos no grupo de doentes e no grupo controlo.

	Diâmetro (μm)	Área (μm^2)	Altura (μm)	Volume (μm^3)	Alongamento	Rugosidade da membrana eritrocitária (nm)
Doentes ELA n=23	8,64 \pm 0,001	58,98 \pm 0,130	0,63 \pm 0,002	31,61 \pm 0,215	0,14 \pm 0,002	4,65 \pm 0,296
Controlos n=17	8,74 \pm 0,016	60,32 \pm 0,223	0,61 \pm 0,002	33,81 \pm 0,284	0,12 \pm 0,002	6,52 \pm 0,533
p <	<0,0001 ***	< 0,0001 ***	<0,0001 ***	< 0,0001 ***	< 0,0001 ***	0.0023 **

Foram analisadas por AFM, as seguintes propriedades morfológicas dos eritrócitos: diâmetro, área, altura, volume, alongamento e rugosidade da membrana eritrocitária. A análise morfológica foi efectuada por um software específico (*Image Metrology - SPIP™ - Scanning Probe Image Processor*) baseado nas imagens de AFM.

Da análise morfológica dos eritrócitos, por AFM, observámos os seguintes resultados na população de ELA, comparativamente com o grupo controlo:

- menor área dos eritrócitos (58,98 \pm 0,130 μm^2 vs. 60,32 \pm 0,223 μm^2 , respectivamente, *** $p < 0,0001$) (Figura 33 a).
- aumento da altura (0,63 \pm 0,002 μm vs. 0,61 \pm 0,002 μm , respectivamente, *** $p < 0,0001$) (Figura 33 b).
- menor diâmetro (8,64 \pm 0,001 μm vs. 8,74 \pm 0,016 μm , respectivamente, *** $p < 0,0001$) (Figura 33 c).
- menor volume (31,61 \pm 0,215 μm^3 vs. 33,81 \pm 0,284 μm^3 , respectivamente, *** $p < 0,0001$) (Figura 33 d).
- mais alongados (0,14 \pm 0,002 vs. 0,12 \pm 0,002, respectivamente, $p < 0,0001$) (Figura 35)

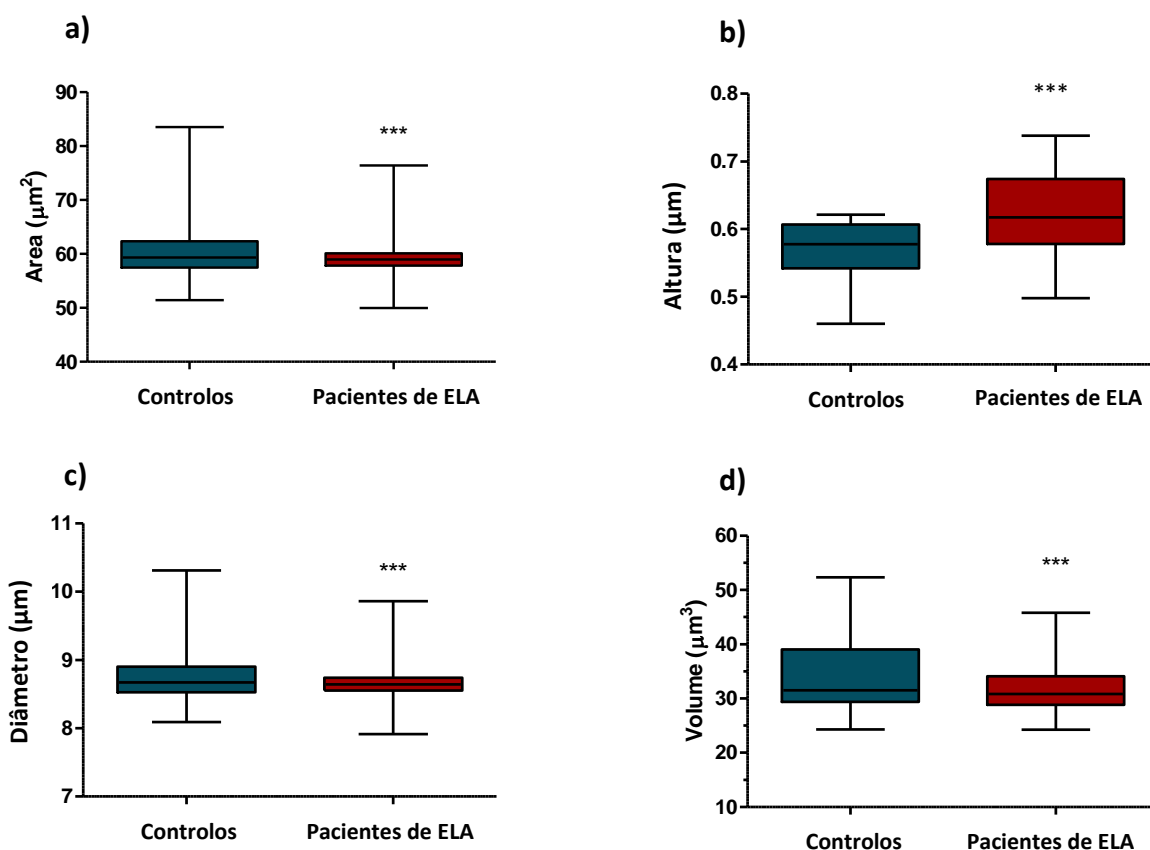


Figura 33 | Propriedades morfológicas dos eritrócitos.

Caracterização morfológica de eritrócitos, através da análise de diferentes parâmetros: área (a), altura (b) diâmetro (c) e volume (d). Os valores são apresentados como *boxplot* com valor médio e com valores máximos e mínimos. Os valores estatísticos representados são: (a, b, c, d) *** $p < 0,0001$.

Através da análise de imagens de AFM foi possível avaliar a rugosidade da superfície dos eritrócitos (Figura 34). A média de rugosidade da membrana de eritrócitos ((Rq) *Root mean square roughness* (nm)) foi avaliada sendo definida pela média dos valores absolutos da altura do perfil de superfície. Observou-se que a superfície da membrana eritrocitária dos pacientes com ELA é menos rugosa do que a superfície dos eritrócitos do grupo controlo ($5,593 \pm 0,1068$ vs $7,767 \pm 0,1475$, respectivamente, $p < 0,0001$).

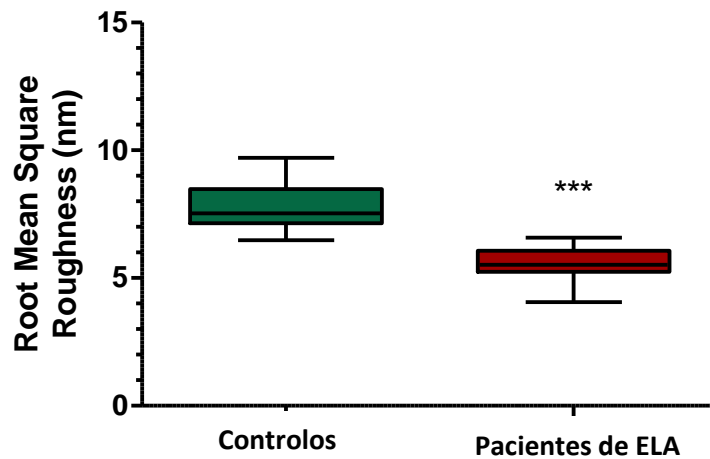


Figura 34 | Rugosidade da superfície da membrana dos eritrócitos.

A rugosidade da superfície da membrana dos eritrócitos foi medida para o grupo controlo (n = 17) e em pacientes com ELA (n = 23).

Foi medida a rugosidade média (Rq) (*Root mean square roughness (nm)*) - Os valores são apresentados como *boxplot* com valor médio com valores máximos e mínimos. O valor estatístico representado: *** $p < 0,0001$. A rugosidade dos eritrócitos foi efectuada com recurso ao Software - *Gwyddion software v.2.45 (Czech Metrology Institute, Czech Republic)*.

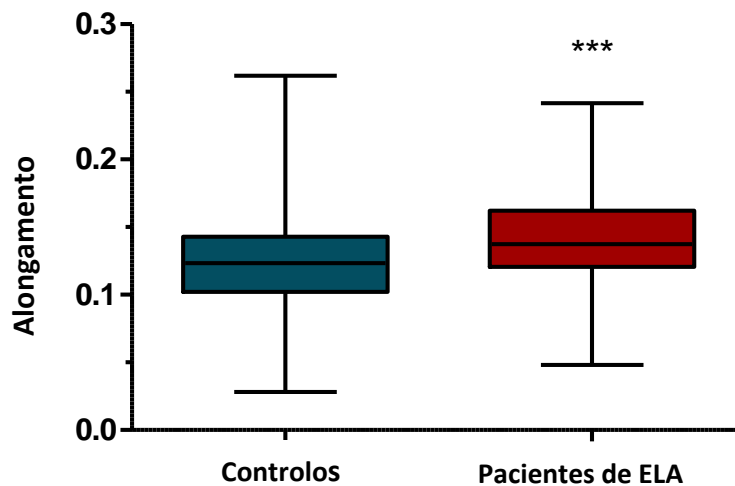


Figura 35 | Estudo do alongamento dos eritrócitos.

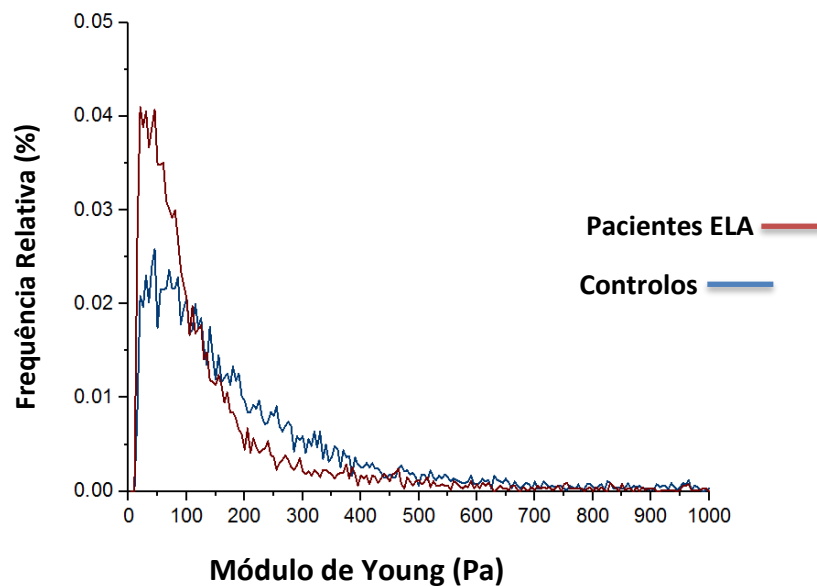
Os eritrócitos dos pacientes com ELA apresentam uma forma mais alongada do que os eritrócitos do grupo controlo. Os valores são apresentados como *boxplot* com valor médio com valores máximos e mínimos. O valor estatístico representado: *** $p < 0,0001$.

b) Espectroscopia de Força – Propriedades Elásticas

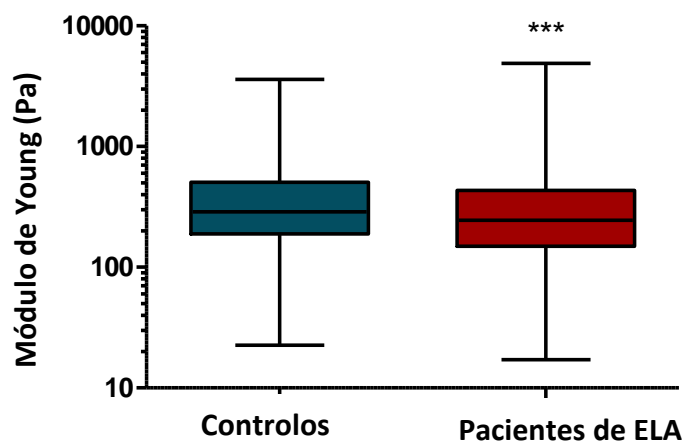
Paralelamente às técnicas aplicadas, foram realizadas medidas de espectroscopia de força em AFM, para analisar a elasticidade dos eritrócitos dos pacientes com ELA e

dos eritrócitos do grupo controlo. Todos os dados da espectroscopia de força foram analisados para determinar o módulo de *Young* (Figura 36 a) e b)) e a profundidade de penetração no eritrócito (Figura 36 c)) para cada curva força-distância. Os eritrócitos de pacientes com ELA são menos rígidos do que os eritrócitos do grupo controlo ($341,0 \pm 21,58$ Pa vs. $452,4 \pm 18,41$ Pa, respectivamente, $***p=0,0003$). A profundidade de penetração (Figura 36 c)) foi analisada pela posição do movimento máximo do sensor piezoelétrico no eixo z, que corresponde à coordenada do eixo z quando o sensor atinge uma força de indentação de 300 pN, subtraindo a posição do eixo z do sensor quando a ponta entra em contacto com a superfície do eritrócito 0 nm. Os eritrócitos dos pacientes com ELA têm mais profundidade de penetração do que os eritrócitos do grupo controlo, indicando que os eritrócitos dos pacientes com ELA apresentam maior capacidade de se deformar do que os eritrócitos do grupo controlo ($903,2 \pm 6,758$ nm vs. $874,1 \pm 7,068$ nm, respectivamente, $** p = 0,0049$).

a)



b)



c)

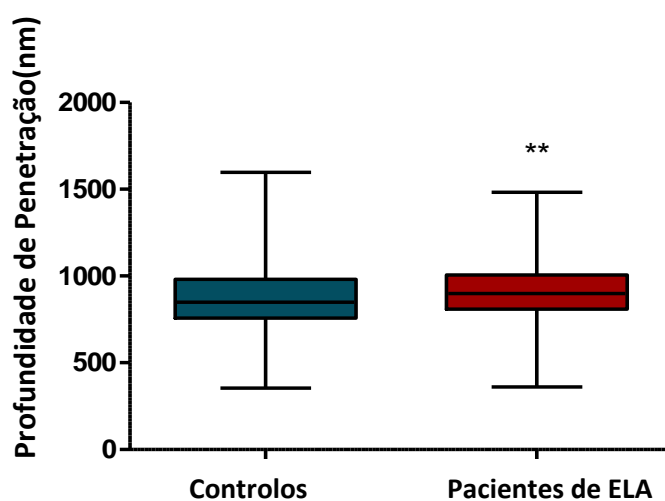


Figura 36 | Estudo de elasticidade eritrocitária medidos por AFM para o grupo controlo (n = 17) e pacientes com ELA (n = 23).

(a) Histograma da distribuição do módulo de *Young*, em Pa (b) Frequência relativa do módulo do *Young*, relativamente aos pacientes de ELA e controlos A rigidez dos eritrócitos (módulo de *Young* (Pa) é representada por valores medianos em escala logarítmica, (***) $p < 0,0001$) (c) Profundidade de penetração (nm) da ponta do AFM nos eritrócitos, para uma força aplicada de 300 pN, (** $p = 0,0049$). Os valores (alíneas a) e b)) são apresentados num *boxplot*, com valor médio e com valores máximos e mínimos.

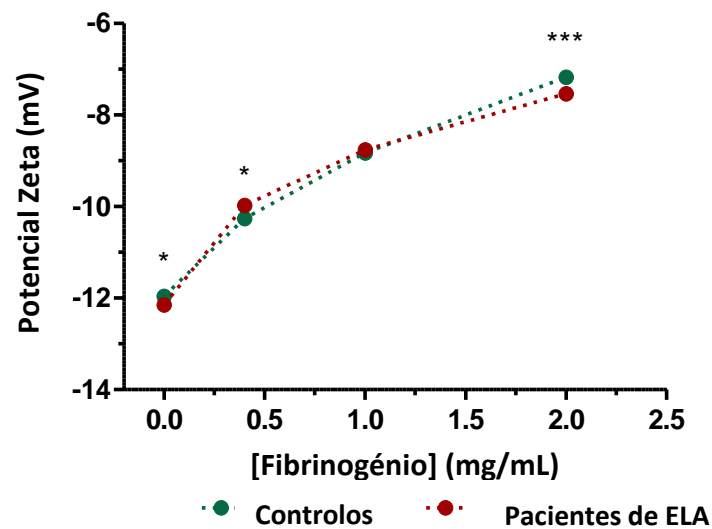
4.2.2. Caracterização das Alterações nas Propriedades da Membrana Eritrocitária de Pacientes com ELA

Estudo do Potencial Zeta na superfície da membrana dos eritrócitos

O potencial Zeta da superfície da membrana dos eritrócitos foi igualmente avaliado, (Figura 37) para analisar a variação das forças electrostáticas nos eritrócitos de pacientes com ELA e controlos, na ausência ou na presença de diferentes concentrações de fibrinogénio. Sem a adição de fibrinogénio, pode observar-se que

os eritrócitos de pacientes com ELA têm uma carga superficial mais negativa que os eritrócitos do grupo controlo ($-11,96 \pm 0,07$ mV vs. $-12,1 \pm 0,04$ mV, $*p = 0,0295$, respectivamente) (Figura 37 a). Quando o fibrinogénio (0,4 mg/mL) foi adicionado, a carga de eritrócitos de pacientes com ELA alterou-se sendo menos negativa que no controlo ($-9,977 \pm 0,11$ mV vs. $-10,27 \pm 0,08$ mV, $*p = 0,0430$, respectivamente). Aumentando a adição de fibrinogénio, 2 mg/mL, a carga dos eritrócitos tornou-se ainda mais negativa em pacientes com ELA do que nos controlos, com diferenças estatisticamente significativas entre elas (Figura 37) ($-7,174 \pm 0,07$ mV vs. $-7,540 \pm 0,55$ mV, $***p < 0,0001$, respectivamente). Numa concentração elevada de fibrinogénio, as membranas dos eritrócitos podem estar saturadas de moléculas de fibrinogénio, conduzindo a uma menor variação da carga da membrana celular com o aumento da adição de fibrinogénio.

a)



b)

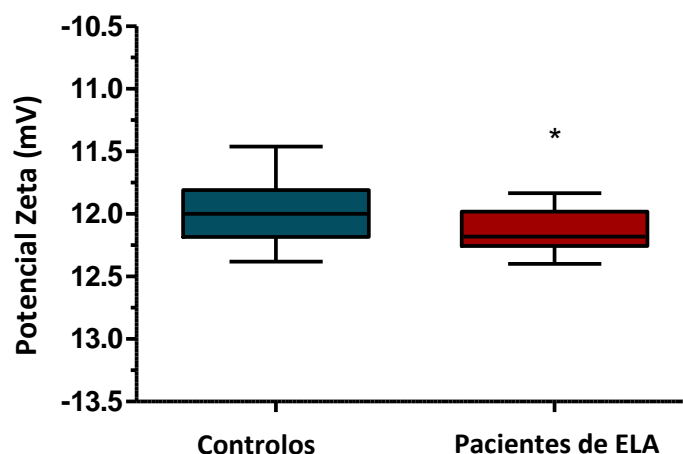


Figura 37| Medidas de potencial zeta em eritrócitos.

(a) Potencial zeta de eritrócitos de pacientes com ELA ($n = 23$) e grupo controlo ($n = 17$), com a adição de diferentes concentrações de fibrinogénio ($p < 0.0001$).

(b) As membranas dos eritrócitos dos pacientes com ELA são mais carregadas negativamente sem a adição do fibrinogénio do que as membranas eritrocitárias dos eritrócitos do grupo controlo ($*p = 0,0295$).

4.2.3. Estudo de Propriedades do Eritrócito no Sangue

4.2.3.1. Propriedades Hemorreológicas

O estudo da hemorreologia é importante uma vez que estuda a circulação sanguínea num vaso, focando-se no comportamento dos eritrócitos e a sua interação com outras células sanguíneas e as paredes dos vasos sanguíneos.

Para o estudo das propriedades hemorreológicas, nomeadamente para o parâmetro da deformabilidade (em diferentes valores de tensão de cisalhamento, 0,6; 6 e 30 Pa) estudámos propectivamente 96 pacientes com ELA seguidos no nosso centro. No mesmo período e usando a mesma metodologia, estudámos 149 controlos saudáveis. Na amostra de pacientes de ELA, a amostra foi constituída por 56 homens (57,72%) e 40 mulheres (42,28%), com idade média de 62,25 (SD=10,48). A população de controlos foi constituída por 86 homens (57,72%) e 63 mulheres (42,28%), com idade média de 45,93 anos (SD=11,56).

Os principais parâmetros avaliados, foram: deformabilidade eritrocitária, agregação eritrocitária e viscosidade sanguínea. Para alguns parâmetros o valor de n foi variável, e será referenciado em cada um dos parâmetros analisados.

a) Agregação Eritrocitária

A agregação dos eritrócitos foi medida por um agregómetro pela transmissão da luz infravermelha através de uma suspensão de sangue total, em estase, ao fim de 10 segundos, com a adição de diferentes concentrações de fibrinogénio (0,0, 40,0 e 80,0 mg/dL) (Figura 38). Pode observar-se que, sem adição de fibrinogénio, os eritrócitos dos pacientes com ELA apresentam maior tendência para agregar do que nos controlos ($18,41 \pm 0,4550$ vs. $16,50 \pm 0,3213$ respectivamente, $*** p < 0,0005$). Com a adição de fibrinogénio, houve um aumento da agregação eritrocitária em ambos os grupos, mas as diferenças entre os pacientes com ELA e os valores de controlo não foram estatisticamente significativos.

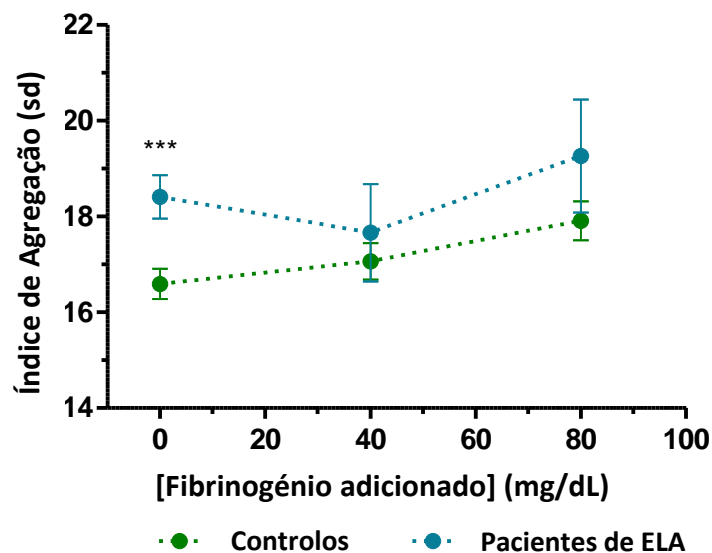


Figura 38 | Estudo de agregação dos eritrócitos de amostras de pacientes de ELA (n=86) e grupo controlo (n=149).

Eritrócitos de pacientes com ELA agregam mais sem adição de fibrinogénio do que no grupo controlo, durante 10 s, ($p < 0,0005$).

b) Deformabilidade Eritrocitária

Os resultados estão representados na Figura 39 e na tabela 21. Pode observar-se que, com baixa tensão de cisalhamento (0,6 Pa), que representa vasos de maior diâmetro, os eritrócitos dos doentes com ELA, são mais deformáveis ($5,978 \pm 0,242$ e $4,602 \pm 0,161$, respectivamente, $*** p < 0,0001$). Valores mais elevados de tensão de cisalhamento (30 Pa), em vasos de menor diâmetro, promovem aumento da deformabilidade dos eritrócitos. Em vasos de menor diâmetro, os eritrócitos de

pacientes com ELA tendem a ser mais deformáveis do que os eritrócitos do grupo controle. Sendo esta diferença estatisticamente significativa.

Tabela 21 | Análise descritiva da deformabilidade eritrocitária. Valores apresentados em média \pm SEM.

Deformabilidade (Pa)	0.6	6	30
Controlos n=149	4,602 \pm 0,1614	35,78 \pm 0,2923	44,67 \pm 0,4478
Pacientes de ELA n=87	5,978 \pm 0,2422	39,68 \pm 0,4155	49,82 \pm 0,6796
p value	***P<0.0001	***P<0.0001	***P<0.0001

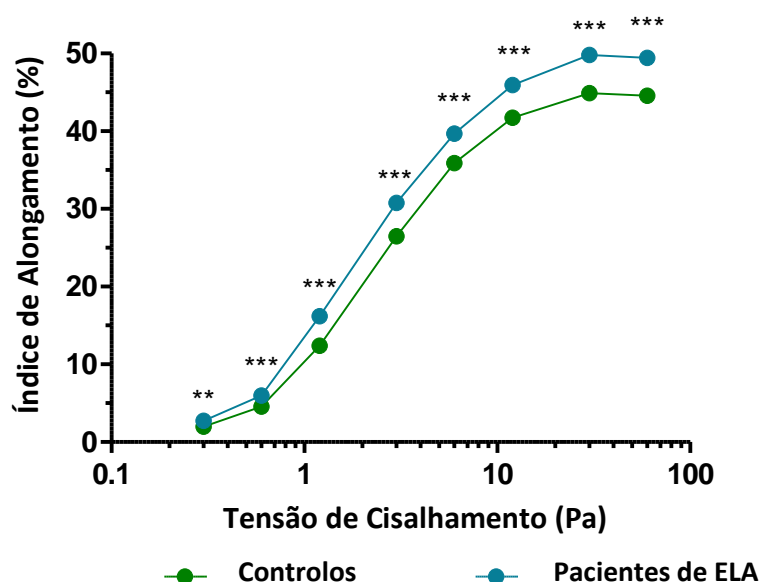


Figura 39 | Estudo de parâmetros hemorreológicos de pacientes de ELA (n=87) e grupo controle (n=149).

Os eritrócitos de pacientes com ELA (são mais deformáveis que os eritrócitos do grupo controle (***) $p < 0,0001$). Os valores de maior deformabilidade do eritrócito aqui apresentado, estão de acordo com os resultados obtidos da medição da elasticidade do eritrócito por AFM.

c) Viscosidade Sanguínea

A viscosidade sanguínea foi medida para os pacientes de ELA e para o grupo controle, a taxas de cisalhamento baixas ($22,5 \text{ s}^{-1}$) e elevadas (225 s^{-1}) tanto para o hematócrito nativo, como corrigido a 45%.

Na viscosidade sanguínea nativa e na baixa taxa de cisalhamento, os pacientes com ELA, tendem a ter maior viscosidade sanguínea do que no grupo controle, com significado estatístico ($8,49 \pm 0,574 \text{ mPa.s}$ vs. $7,508 \pm 0,181 \text{ mPa.s}$, respectivamente,

$p=0,0504$). Para a mesma taxa de cisalhamento com hematócrito corrigido a 45% não existe diferença ($7,310 \pm 0,086$ vs. $7,355 \pm 0,288$, respectivamente, $p=0,8533$). Nas condições de elevada taxa de cisalhamento, a viscosidade sanguínea é similar em ambas as populações ($4,696 \pm 0,212$ mPa vs. $4,473 \pm 0,884$ mPa, respectivamente, $p=0,31$), o que persiste nas condições com hematócrito a 45% ($4,51 \pm 0,05$ mPa.s vs. $4,60 \pm 0,19$ mPa.s, respectivamente).

A Figura 40 mostra os resultados para a viscosidade do sangue total medida em amostras de pacientes com ELA e no grupo controlo, em baixas ($22,5 \text{ s}^{-1}$) e elevadas (225 s^{-1}) taxas de cisalhamento (*shear rates*), a 37°C , ambas para o hematócrito nativo. A taxa de cisalhamento aplicada e o diâmetro dos vasos são inversamente proporcionais, mimetizando o processo fisiológico. Um aumento da taxa de cisalhamento, promove uma diminuição da viscosidade do sangue, estando esta relacionada com vasos de menor diâmetro.

Tabela 22 | Análise descritiva da viscosidade sanguínea, em amostras de pacientes com ELA e controlos.

Viscosidade Sanguínea (mPa.s)	<i>Low Shear rate</i>	<i>High Shear rate</i>	<i>Low Shear rate</i>	<i>High Shear rate</i>
	<i>native</i>	<i>native</i>	<i>45% (Ht)</i>	<i>45% (Ht)</i>
	Baixas taxas cisalhamento ($22,5 \text{ s}^{-1}$) mPa.s	Elevadas taxas cisalhamento (225 s^{-1}) mPa.s	Baixas taxas cisalhamento ($22,5 \text{ s}^{-1}$) mPa.s	Elevadas taxas cisalhamento (225 s^{-1}) mPa.s
Controlos	$7,508 \pm 0,181$	$4,473 \pm 0,884$	$7,355 \pm 0,288$	$4,518 \pm 0,049$
Pacientes de ELA	$8,489 \pm 0,5739$	$4,696 \pm 0,212$	$7,310 \pm 0,086$	$4,448 \pm 0,1330$
<i>p value</i>	0,0504	0,3164	0,8533	0,8167

A viscosidade do sangue total foi medida em amostras de pacientes com ELA e em amostras de controlos, a viscosidade nativa e corrigida para um hematócrito de 45% e em baixas ($22,5 \text{ s}^{-1}$) e altas (225 s^{-1}) taxas de cisalhamento (*shear rates*). A amostra de pacientes de ELA para a viscosidade nativa para taxas de cisalhamento baixas e elevadas para os pacientes de ELA ($n=14$) e grupo controlo ($n=81$); Pacientes de ELA para o estudo da viscosidade sanguínea para o hematócrito corrigido a 45%, para taxas de cisalhamento baixas e elevadas para os pacientes de ELA ($n=13$) e grupo controlo ($n=78$). Os valores são apresentados como média \pm SEM. Ht| Hematócrito.

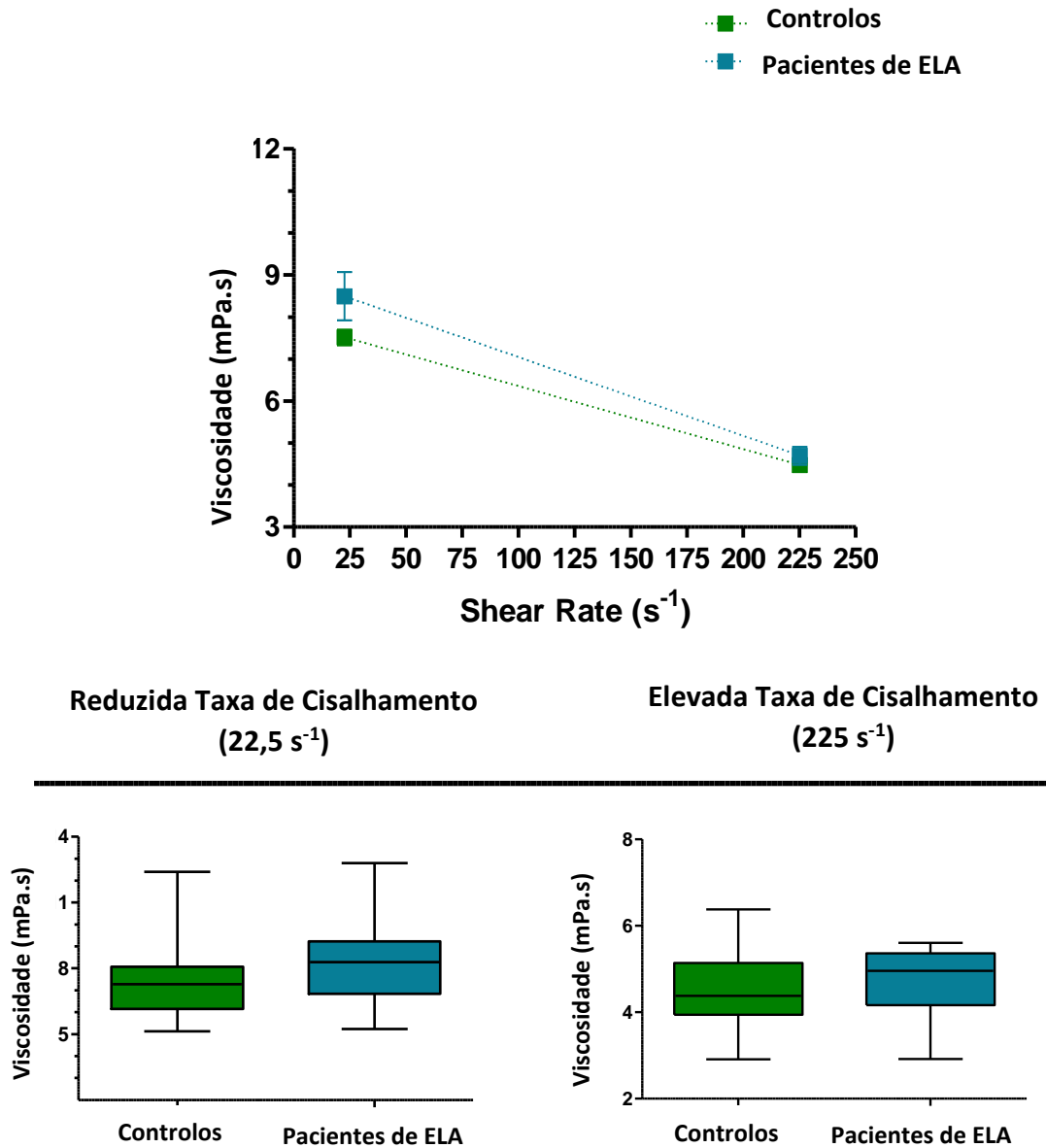


Figura 40| Estudo da viscosidade sanguínea em pacientes de ELA (n=14) e grupo controlo (n=78).

A viscosidade do sangue total foi medida em amostras de pacientes com ELA e de controlos a taxas de cisalhamentos (*shear rate*) baixas (22,5 s⁻¹) e elevadas (225 s⁻¹), para o hematócrito nativo, a 37°C. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos. Além disso, tal como esperado, a uma baixa taxa de cisalhamento, o grupo de pacientes com ELA e o grupo controlo, apresentaram maior viscosidade do que a uma elevada taxa de cisalhamento.

4.2.3.2. Propriedades Hematológicas

Neste estudo, analisaram-se os parâmetros de hemograma nos doentes e num grupo de controlos saudáveis (Tabela 23). Estudámos prospectivamente amostras de 21 doentes seguidos no nosso centro. No mesmo período e usando a mesma metodologia, estudámos 80 controlos saudáveis. Na amostra de pacientes de ELA, a amostra foi constituída por 12 homens (57,14%) e 9 mulheres (42,86 %), com idade média de 66,9 (SD=8,85) e a duração média de doença 38,28 meses (SD=58,71). Na população de controlos, foi constituída a amostra por 45 homens (56,25%) e 35 mulheres (43,75%) com idade média de 44,45 (SD=11,86). O valor entre grupos para a idade $p < 0,0001$.

Tabela 23 | Análise descritiva dos parâmetros hematológicos determinados no hemograma.

Parâmetro	Pacientes de ELA n=21	Grupo Controlo n=80	p value
RBC (10 ⁶ / μl)	5,58 ± 0,21	5,31 ± 0,08	0.1687
HGB (g/dL)	14,36 ± 0,24	15,67 ± 0,26	0,0004*
HCT (%)	49,23 ± 1,74	45,36 ± 0,65	0.0141
MCV (fL)	88,37 ± 0,95	85,23 ± 0,56	0.0104
MCH (pg)	30,70 ± 0,35	29,65 ± 0,25	0.8271
MCHC (g/dL)	34,74 ± 0,27	34,67 ± 0,15	0,0466
RDW SD (fL)	43,70 ± 0,95	42,85 ± 0,80	0.6029
PLT (10 ³ / μl)	173,8 ± 12,74	214,9 ± 7,04	0,008
PDW (fL)	13,69 ± 0,49	15,80 ± 1,90	0,5695
MPV (fL)	11,56 ± 0,25	11,70 ± 0,13	0,6291
PLCR (%)	40,26 ± 1,33	38,66 ± 2,54	0.5809

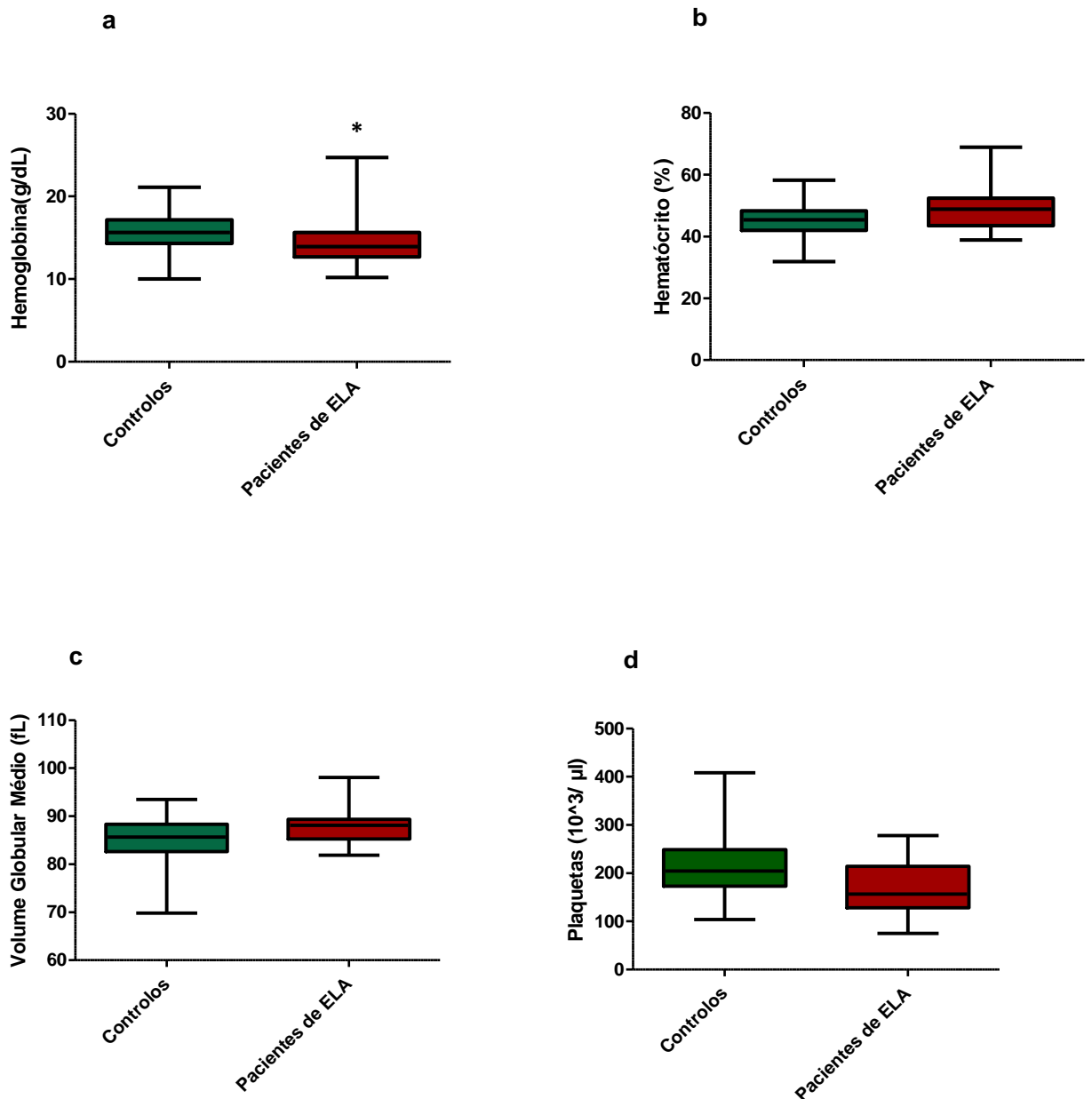
WBC (10 ³ / μl)	7,23 ± 0,43	6,42 ± 0,19	0.0594
W-SCC (10 ³ / μl)	1,91 ± 0,11	2,010 ± 0,06	0,4273
W-SCR (10 ³ / μl)	27,29 ± 1,58	31,55 ± 0,68	0,0068
W- MCC (10 ³ / μl)	1,671 ± 0,22	1,443 ± 0,08	0,2049
W-MCR (10 ³ / μl)	23,26 ± 2,37	22,32 ± 0,937	0.6656
W-LCC (10 ³ / μl)	3,652 ± 0,351	2,968 ± 0,13	0,0278
W-LCR (10 ³ / μl)	49,45 ± 3,099	45,97 ± 1,13	0.2009
Razão Neutrófilos/Linfócitos	2,067 ± 0,267	1,538 ± 0,067	0,0061
Razão Plaquetas/Linfócitos	95,92 ± 8,39	111,7 ± 4,11	0,0855

Legenda da Tabela: Valor de *p* corrigido (*Bonferroni*) significativo para $p < 0,0004$.*

Parâmetros avaliados : RBC| Número de eritrócitos (10⁶/μl); HGB|Hemoglobina (g/dL); HCT|Hematócrito (%); MCV| Volume globular médio (fL); MCH| Hemoglobina globular média (pg); MCHC|Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; RDW SD|Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos medido como Desvio Padrão (fL); PLT| Plaquetas (10³/ μl); PDW | Amplitude de variação do tamanho das plaquetas (fL); MPV|Volume plaquetário médio (fL); P-LCR| Percentagem de plaquetas grandes (com volume maior que 12 fL) (%)

Estão igualmente representados os valores do leucograma, nomeadamente: WBC|Contagem de Glóbulos brancos ou leucócitos ($10^3/\mu\text{l}$); W-SCC|Valor absoluto de linfócitos ($10^3/\mu\text{l}$); W-SCR| % de linfócitos no total de leucócitos (%); W-MCC| Valor absoluto de monócitos ($10^3/\mu\text{l}$); W-MCR| % Razão de monócitos no total de leucócitos (%); W-LCC| Número absoluto de neutrófilos ($10^3/\mu\text{l}$); W-LCR| % de neutrófilos no número total de leucócitos ($10^3/\mu\text{l}$); NLR|Razão do número total de neutrófilos /linfócitos; PLR|Razão do número total de plaquetas/linfócitos.

A figura 41 representa a comparação entre os dois grupos para os diferentes parâmetros:



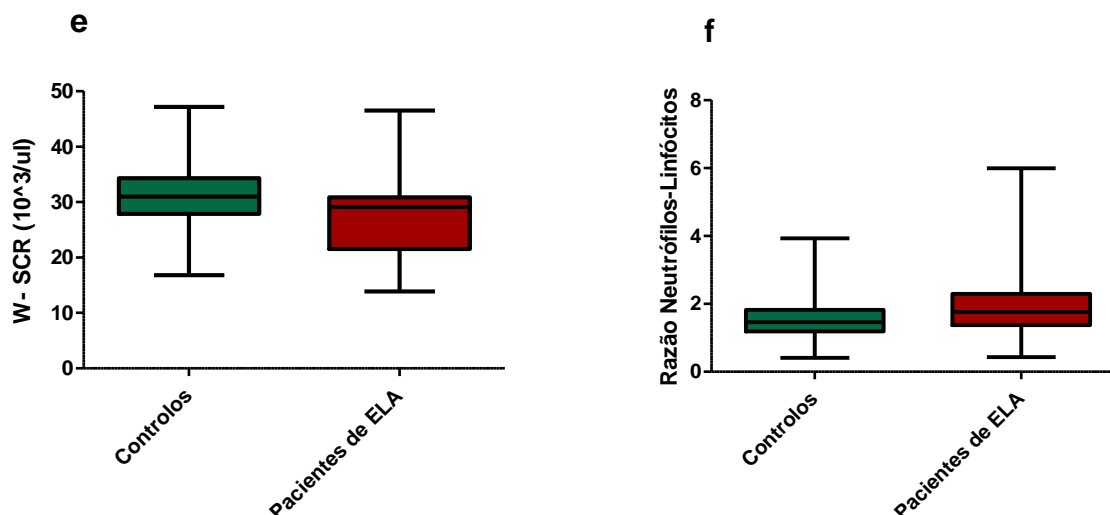


Figura 41 | Estudo dos parâmetros eritrocitários obtidos por hemograma, para o grupo controlo (n = 80) e pacientes com ELA (n =21).

Boxplot com a distribuição dos diferentes parâmetros mais significativos estatisticamente. a) hemoglobina; b) hematócrito; c) Volume globular médio ; d) plaquetas; e) W-SCR; f) razão do número total de neutrófilos/linfócitos.

O valor da hemoglobina nos doentes é menor quando comparada com os controlos (14,36±0,24 e15,67±0,26, respectivamente, * $p=0,0004$). As restantes comparações não alcançam significado estatístico com a correcção para múltiplas comparações.

4.2.4. DISCUSSÃO DE RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA, MORFOLÓGICA E HEMORREOLÓGICA DOS ERITRÓCITOS NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA

4.2.4.1. Parâmetros Clínicos e Hemorreológicos Alterados na Doença

O estudo do eritrócito e as suas propriedades biofísicas, morfológicas, hemorreológicas e elásticas nunca foram abordadas na ELA, até esta data.

Concentrações aumentadas de fibrinogénio⁷⁷⁹ e agregação eritrocitária⁷⁸⁰ têm sido considerados factores que aumentam significativamente o risco de doenças cardio e cerebrovasculares. Sabe-se que os eritrócitos têm um papel fundamental na ligação de mediadores inflamatórios a receptores de superfície, aumentando a sua agregação. Esse processo, juntamente com o fibrinogénio, tem implicações patogénicas na formação de trombos, promovendo eventos trombóticos.^{705,734}

A agregação eritrócitária tornou-se uma questão de interesse crescente devido às suas implicações ao nível do possível risco de eventos trombóticos vasculares. Em condições inflamatórias, ocorrem uma série de mudanças nas propriedades biofísicas dos eritrócitos, com repercussão na agregação, velocidade de sedimentação e deformabilidade destas células. Intimamente associado está o aumento ou alteração do perfil de fibrina associado à hipercoagulabilidade sanguínea. A literatura também sugere que a inflamação causa aumento dos níveis séricos de ferritina.

Existe forte evidência de que a inflamação está associada à ELA, provavelmente mais relevante aquando da insuficiência respiratória. Tal pode estar potencialmente relacionado com o aumento do fibrinogénio e com o risco de tromboembolismo venoso.^{39,40} A complexa interacção entre a insuficiência respiratória, inflamação, alterações do fibrinogénio e da membrana dos eritrócitos, com implicações na perfusão periférica, nunca foi explorada na ELA.

Para além das alterações na agregação eritrocitária, foram observadas alterações na deformabilidade e na morfologia dos eritrócitos na ELA.

Relativamente à deformabilidade dos eritrócitos, observámos uma maior deformabilidade do que no grupo de controlo. Estes resultados, estão de acordo com os obtidos na medição da elasticidade do eritrócito por AFM. Observámos diferenças na elasticidade ou rigidez dos eritrócitos isolados (módulo de *Young*, ver resultados de AFM), com diminuição da rigidez celular (ou aumento da elasticidade) nos pacientes com ELA.

Os eritrócitos são células bastante deformáveis, sendo que esta propriedade física contribui fundamentalmente para auxiliar o fluxo sanguíneo, em particular na microcirculação.

As propriedades e associações das proteínas esqueléticas da membrana, a relação entre a área superficial da membrana e o volume celular, a morfologia celular e a viscosidade citoplasmática, são factores que modulam a deformabilidade dos eritrócitos. Portanto, não é surpreendente que a deformabilidade dos eritrócitos seja significativamente alterada por alterações nas condições fisiopatológicas, ou vice-versa.³⁴

A deformabilidade eritrocitária é um influente factor bio-hematológico para a viscosidade do sangue e a oxigenação celular, dependente do processo inflamatório agudo ou crónico.^{781,782} Tem sido descritas alterações da deformabilidade da

membrana eritrocitária na doença de Alzheimer,³⁴ com implicações na microcirculação cerebral.³⁴

4.2.4.2. Microscopia de força atômica (AFM) – Morfologia e Propriedades da Membrana

A partir dos resultados do AFM foi possível avaliar as propriedades morfológicas e elásticas dos eritrócitos e concluir que os eritrócitos dos pacientes com ELA têm menor área, menor diâmetro e menor volume, quando comparados com os eritrócitos do grupo controlo, embora tenham maior altura e sejam mais alongados. Pelas imagens de AFM é possível visualizar a tendência para uma diminuição da concavidade nos eritrócitos. Relativamente, às propriedades da membrana, os eritrócitos dos pacientes com ELA apresentam menor rugosidade da membrana. Estes resultados suportam que, na ELA, ocorrem alterações na membrana dos eritrócitos,⁷⁸³ provavelmente por modificações nas proteínas estruturais.^{783,784}

A deformabilidade está directamente ligada às propriedades da membrana dos eritrócitos, incluindo rigidez e elasticidade.^{34,722,785,786}

A deformabilidade do eritrócito está também associada à rugosidade da membrana. Quando a célula perde rugosidade, o eritrócito torna-se mais rígido.⁷⁸⁷ Uma das técnicas importantes usadas para avaliar a rigidez da membrana é o módulo de *Young*. Pelo Módulo de *Young*, observámos que os eritrócitos na ELA têm menor rigidez e maior profundidade de penetração. Tal facto, pode ser devido a mudanças nos componentes do citoesqueleto, como as bandas 2.1 (ankyrin) e 4.1, que são as proteínas que proporcionam alterações na rigidez da membrana eritrocitária.⁷⁸⁴ Uma alteração na composição lipídica (fosfolípidos, glicolípidos) e perda de assimetria entre os folhetos interno e externo da bicamada lipídica também está associada à senescência dos eritrócitos. O estudo das alterações lipídicas e de proteínas membranares nos eritrócitos dos doentes com ELA será alvo de estudo em futuras experiências no nosso laboratório.

Alterações na morfologia dos eritrócitos já foram descritas na doença de Alzheimer e na diabetes, atribuídas principalmente às alterações nas proteínas membrana/citoesqueleto envolvidas na regulação da forma, estabilidade e elasticidade dos eritrócitos.^{34,788,789}

Os nossos estudos sobre o potencial zeta na superfície da membrana dos eritrócitos revelaram que a membrana dos eritrócitos tem alterações na carga potencial da

superfície da membrana corroborando com os achados anteriores. Essas alterações da carga eléctrica na membrana dos eritrócitos podem promover interacções entre fibrinogénio e eritrócitos e entre eritrócitos e eritrócito, constituindo um factor de risco para um evento tromboembólico venoso e de hipóxia tecidual.

Os eritrócitos dos doentes com ELA têm uma carga eléctrica mais negativa à superfície, o que poderá indicar alterações ao nível dos lípidos e/ou proteínas de membranas, como a exposição de fosfatidilserina existente no processo de envelhecimento eritrocitário ou o aumento da concentração de ácidos siálicos na membrana. A hipótese que os eritrócitos em doentes de ELA estão mais envelhecidos será alvo de estudo futuramente.

De forma a compreendermos melhor o significado das alterações morfológicas e hemorreológicas encontradas, efectuámos a comparação dos parâmetros do hemograma entre pacientes com ELA e um grupo controlo. A hemoglobina revelou valores ligeiramente mais baixos nos doentes, o que seria expectável numa doença crónica, com implicações inflamatórias. As outras comparações não foram significativas para o valor de p corrigido, com uma tendência para maior valor de hematócrito e volume globular médio nos doentes, provavelmente devido a factores nutricionais e de desidratação. No entanto, as diferenças encontradas quanto à concentração de hemoglobina não justificam os restantes resultados descritos que indicam uma modificação da membrana eritrocitária, com repercussões hemorreológicas, morfológicas e electrostáticas.

As nossas observações fornecem dados que sugerem que os eritrócitos são actores importantes na ELA, de acordo com estudos de outros grupos em outras doenças neurodegenerativas e metabólicas.^{34,682} As alterações encontradas nos eritrócitos podem derivar do processo inflamatório e perturbar a microcirculação, em particular no sistema nervoso central, sendo que a hipóxia é um elemento favorecedor da inflamação.³⁴ No cérebro, a privação de oxigénio leva à libertação excessiva de glutamato e à morte celular neuronal induzida pela activação do receptor NMDA.⁷⁹³

Os nossos resultados são importantes para futuramente se identificar um possível marcador molecular precoce de identificação da disfunção respiratória na ELA.

4.3. DISCUSSÃO GERAL E INTEGRADA

A ELA tem um curso progressivo caracterizado por agravamento da incapacidade e morte, sendo o tempo de progressão da doença muito variável entre os doentes. Essa heterogeneidade torna difícil prever como a ELA progredirá num determinado indivíduo, de forma a avaliar de forma mais objectiva a eficácia de novos tratamentos em ensaios clínicos.⁶⁰⁸ O prognóstico incerto da ELA é desconfortável para os pacientes e respectivas famílias, que têm de lidar com um crescente número de dificuldades, num período de tempo imprevisível. Ser capaz de melhor discriminar a progressão da ELA pode permitir que doentes e médicos tomem melhores decisões sobre medidas como a ventilação e o suporte nutricional.⁵⁸²

O conhecimento antecedente e o trabalho desenvolvido pelo nosso grupo na ELA, originaram hipóteses inovadoras e pertinentes a serem testadas, muitas das quais constituem o propósito desta Tese de Doutoramento. Os principais objectivos que propusemos investigar foram (vd. "Objectivos do projecto" no Capítulo I): a) Estudar um conjunto de biomarcadores respiratórios/Inflamação (CC-16 e IL-6, creatinina e fibrinogénio γ' plasmático) quanto ao valor de prognóstico do declínio da função respiratória, para além do declínio funcional e sobrevida, na ELA; b) Avaliar as propriedades hemorreológicas, morfológicas e biofísicas dos eritrócitos, de forma a atingir dois objectivos essenciais: 1) Analisar a complexa interacção entre a função respiratória, a taxa de progressão da doença e sobrevida na ELA; 2) Encontrar um biomarcador molecular de disfunção respiratória precoce nos doentes.

Os factores prognósticos conhecidos para ELA incluem a idade inicial da doença, fenótipo, tempo decorrido entre os primeiros sintomas até ao diagnóstico, incapacidade funcional inicial e a rapidez do seu declínio (ALSFRS-R), a capacidade respiratória inicial e a rapidez do seu declínio, a capacidade cognitiva e o índice de massa corporal (IMC).⁷⁹⁰ Muitos outros potenciais marcadores prognósticos têm sido estudados na ELA, incluindo o tabagismo, ácido úrico,⁷⁹¹ a albumina, a creatinina,⁵⁴² os lípidos no sangue,⁷⁹² a ferritina, a transferrina,⁷⁹³ a creatina-fosfoquinase (CK),⁵⁴³ as células T reguladoras^{751,752} e os neurofilamentos.^{520,794,795} O estudo desses marcadores de prognóstico têm, geralmente, conduzido a resultados discordantes.⁷⁹⁶

Como referido anteriormente, a insuficiência respiratória é a principal causa de morte nestes doentes e apesar da extensa investigação na procura de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico na ELA, ainda não foi identificado um marcador molecular que se destaque relativamente ao seu valor ao nível de diagnóstico precoce e/ou prognóstico da insuficiência respiratória. A identificação de biomarcadores moleculares da disfunção respiratória precoce poderá ter um impacto importante no seguimento destes doentes, pela facilidade na aplicação de um método universal que permita informação objectiva, independentemente do fenótipo do doente.

No capítulo anterior, foi incluída uma breve discussão dos resultados obtidos. Neste capítulo, pretende-se uma discussão integrada, visando as necessárias conclusões.

Globalmente, os nossos resultados favorecem a presença de um processo inflamatório crónico na ELA^{469,481} que parece intensificar-se aquando da insuficiência respiratória, tal como documentado pelos nossos resultados com CC-16 e IL-6.⁵⁸⁸ A quantificação do fibrinogénio γ' na nossa população de ELA confirmou valores mais elevados, ainda de acordo com o fenómeno neuroinflamatório,^{359,751,752} no entanto, sem parecer indicar um significado em termos de prognóstico da função respiratória. Na nossa população a creatinina não foi preditora da sobrevida, contrariamente a estudos anteriores.^{751,752} Por outro lado, o valor da creatinina, aquando da primeira consulta, foi preditor do valor da escala funcional, assim como da rapidez do seu declínio. Por último, este biomarcador não foi preditor da função respiratória na avaliação inicial, nem da progressiva perda da função respiratória no curso da doença. Provavelmente, a perda de massa muscular dos membros não tem uma relação directa com a atrofia nem com a parésia dos músculos respiratórios. Para mais complicações inflamatórias do parênquima pulmonar não têm expressão nos níveis de creatininémia, mas poderão tê-la relativamente aos níveis de CC-16 e IL-6, como foi observado nos nossos resultados.

A partir dos resultados do AFM, foi possível avaliar as propriedades morfológicas e elásticas dos eritrócitos e concluir que os eritrócitos dos pacientes com ELA têm menor área, menor diâmetro e menor volume, quando comparados com os eritrócitos do grupo controlo, mas têm maior altura e são mais alongados, resultando numa diminuição da concavidade eritrocitária. Relativamente às propriedades elásticas da membrana, os eritrócitos dos doentes têm menor rugosidade e rigidez, com maior maior elasticidade. Os nossos estudos sobre o potencial zeta revelaram que a

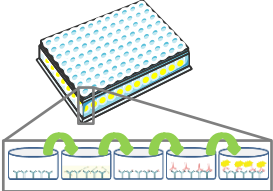
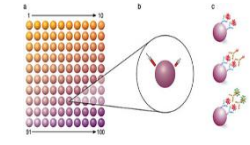
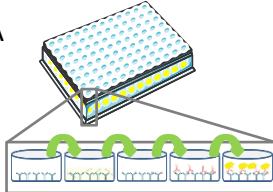
membrana dos eritrócitos é mais negativamente carregada. Todas estas alterações indicam alterações do citoesqueleto da membrana dos eritrócitos, eventualmente por alterações proteicas e/ou lipídicas.


Alterações da morfologia dos eritrócitos assim como das suas propriedades reológicas têm sido associadas a processos inflamatórios.⁷⁹⁷ Estas alterações favorecem fenómenos trombóticos^{36,662,663,700,729} e podem reduzir a microcirculação,^{36,662,663,680,681,682} condicionando hipóxia tecidual. Por outro lado, a hipóxia dos tecidos promove a inflamação^{796,797} estabelecendo um processo de *feedback* positivo que favorece uma cascata de eventos que causam morte neuronal. Observámos ainda maior agregação dos eritrócitos nos doentes com ELA, suportando um risco acrescido de fenómenos trombóticos, assim como de hipoperfusão periférica com risco de hipóxia tecidual. Nos doentes com ELA, os valores do hemograma apenas diferem dos controlos no respeitante a uma ligeira redução da hemoglobina, de acordo com o observado em doenças crónicas. Esta diferença não explica as marcadas diferenças encontradas quanto à hemorreologia e morfologia dos eritrócitos.

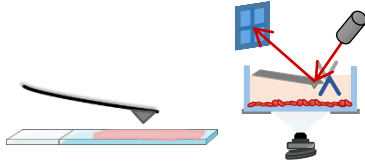
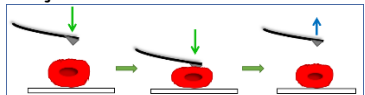
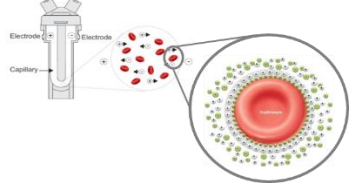
Disfunção semelhante nos eritrócitos foi reportada na doença de Alzheimer,⁷⁸⁵ o que tem sido associado a hipóxia do sistema nervoso central com *noxa* neuronal.³⁴ No entanto, os nossos resultados não permitem aferir do papel destas alterações na progressão dos doentes com ELA, nem como as mesmas são modificadas no curso da doença. Em particular, não foi estabelecido o seu valor como preditor da função respiratória, no quadro do processo inflamatório subjacente. Os nossos resultados são muito consistentes, evidenciando que os eritrócitos nos doentes com ELA têm maior elasticidade, menor rigidez e maior deformabilidade, características que permitem especular que resultam de mecanismos adaptativos que favorecem a oxigenação periférica, em condições adversas de hipoventilação. Estas alterações não estão associadas a modificações da viscosidade, ainda em linha com a hipótese levantada.

De qualquer forma as nossas observações constituem um contributo original, que permite explorar novas áreas na fisiopatologia da ELA, assim como perspectivar inovadoras abordagens terapêuticas, no futuro.

IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES DE DISFUNÇÃO RESPIRATÓRIA NA ELA

Objectivo	Potencial Biomarcador	Metodologia	Resultados e Discussão	Principais conclusões
	Club Cell Secretary Protein (CC-16)	<p>ELISA</p> 	<p>Níveis de CC-16 aumentados em pacientes de ELA vs controlos;</p> <p>Níveis de CC-16 não se correlacionaram com a idade, género, região inicial da doença, duração da doença, ALSFRS-R_{global}, ALSFRS-R_{Respiratório}, FVC e <i>PhrenAmpl</i>;</p> <p>Os pacientes de ELA com níveis aumentados de CC-16, o risco de NIV aumentado nos 6 meses seguintes e observou-se uma tendência para aumento da mortalidade, nos 18 meses seguintes.</p>	<p>Nossos resultados evidenciam o aumento da resposta inflamatória pulmonar relacionada com a disfunção respiratória, com potencial valor prognóstico;</p> <p>Propomos que o aumento dos níveis de CC-16 possa ser um marcador da resposta inflamatória pulmonar, associada à insuficiência respiratória iminente.</p>
	Interleucina-6 (IL-6)	<p>TECNOLOGIA MULTIPLEX</p> 	<p>Níveis de IL-6 correlacionaram-se + com a idade;</p> <p>Na ELA, títulos mais elevados de IL-6;</p> <p>Nível elevado de IL-6 na ELA é um preditor independente do valor do <i>PhrenAmpl</i>, independente da idade.</p>	<p>IL-6 é uma citocina inflamatória multifuncional que está aumentada na ELA;</p> <p>Níveis de IL-6 foram influenciados fisiologicamente pela idade, nos controlos e pela disfunção respiratória na ELA;</p> <p>A IL-6 deverá ser explorada como marcador da falência respiratória na ELA.</p>
	Fibrinogénio gamma' (γ')	<p>ELISA</p> 	<p>Níveis aumentados de Fibrinogénio γ' em doentes de ELA vs controlos</p> <p>Aumento dos níveis de Fibrinogénio γ' em doentes de ELA com preditor de maior sobrevida;</p>	<p>Os níveis mais elevados podem resultar de uma actividade inflamatória persistente relacionada com a patogénese da doença e respectivas complicações;</p> <p>O fibrinogénio γ' pode ter uma acção neuroprotectora.</p>

		Fibrinogénio γ' não foi preditor da perda funcional total (ALSFRS-R _{global} , ALSFRS-R _{Respiratório} e FVC).	Requer mais investigação
Creatinina (Cr)	<p><i>JAFFE</i></p> 	<p>O valor da creatinina plasmática, na primeira avaliação, não foi preditor do declínio da função respiratória (FVC), nem da sobrevivência;</p> <p>A creatinina foi um factor preditivo independente da capacidade funcional da doença (ALSFRS-R), no momento da avaliação.</p>	

Objectivo	Potencial Biomarcador	Metodologia	Resultados Principais	Principais conclusões
	Imagem Eritrócitos Morfologia e propriedades da membrana (ELA vs Controlos)	Microscopia de força atómica (AFM) 	Doentes ELA: Menor área Maior altura Menor diâmetro Menor volume Menor rugosidade Maior alongamento Menor concavidade	Esse conjunto de achados indica uma estrutura anormal da membrana eritrocitária; As anormalidades na morfologia dos eritrócitos podem aumentar o risco de trombose venosa e de hipóxia tecidual na ELA; No geral, nossos resultados são a favor de um aumento da resposta inflamatória pulmonar;
	Propriedades Elásticas do eritrócito (Módulo <i>Young</i> e Profundidade de Penetração)	Microscopia de força atómica- Espectroscopia de força 	Doentes ELA: Módulo <i>Young</i> : Eritrócitos menos rígidos Profundidade Penetração: + profundidade penetração ELA vs controlos	A hipótese dos eritrócitos estarem mais envelhecidos nos doentes de ELA, será alvo de estudos futuros.
	Estudo do potencial zeta na superfície da membrana dos eritrócitos	Potencial Zeta- Eritrócitos 	Pacientes com ELA a superfície dos eritrócitos é mais carregada negativamente vs controlos	

CARACTERIZAÇÃO HEMORREOLÓGICA E HEMATOLÓGICA DOS ERITRÓCITOS NA ELA-ESTUDO DAS PROPRIEDADES DO SANGUE

<p>Deformabilidade Eritrocitária</p>		<p>Os eritrócitos dos pacientes com ELA são mais deformáveis vs controles</p>	
<p>Agregação eritrocitária</p>		<p>Os eritrócitos dos pacientes com ELA agregam mais vs controles</p>	
<p>Viscosidade do sangue total</p>		<p>Os pacientes com ELA apresentam maior viscosidade sanguínea (a baixas e elevadas taxas de cisalhamento) vs controles</p>	
<p>Parâmetros hematológicos</p>	<p>Hemograma</p>	<p>Hemograma: a concentração de hemoglobina é inferior nos pacientes de ELA vs controles</p>	



CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

"It always seems impossible until it's done"

Nelson Mandela

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A ELA é uma doença neurodegenerativa progressiva e fatal, que afecta principalmente os neurónios motores. Pacientes com ELA morrem principalmente de insuficiência respiratória. O diagnóstico não é imediato, requerendo experiência clínica. Os ensaios clínicos têm sido pouco prometedores. Um tratamento eficaz é urgente. A ELA tornou-se uma doença bem identificada desde o final do século XIX, mas sua patogénese ainda é pouco conhecida, apesar dos esforços consideráveis feitos nos últimos anos.

O principal objectivo deste projecto consistiu na pesquisa de potenciais biomarcadores moleculares preditores da função respiratória na ELA e a sua relação com o processo neuroinflamatório associado.

Na presente tese, indicamos novos potenciais biomarcadores, como a CC-16 e a IL-6, com resultados muito interessantes a esclarecer no futuro. O fibrinogénio γ' é um marcador inflamatório, pro-trombótico que está aumentado nos doentes com ELA, mas sem aparente relação com a função respiratória, dados a serem reapreciados futuramente. Verificámos que a creatininémia que espelha a massa muscular não é preditora da insuficiência respiratória, assim reforçando a importância do processo inflamatório como associado à descompensação das trocas gasosas, quer por contribuir para a falência, quer por resultar da hipóxia ou dos processos infecciosos que são originados pela menor *clearance* brônquica e consequente infecção crónica. Reportamos resultados inovadores acerca das propriedades biofísicas, morfológicas e elásticas nos eritrócitos. Estes achados podem resultar de mecanismos adaptativos à hipoventilação, ou de simples alterações na estrutura da parede celular, cujo significado requer maior investigação. Tais resultados abrem caminho a novas abordagens de modo a melhorar a nossa interpretação dos processos associados a disfunção respiratória na ELA.

As principais conclusões obtidas nesta tese são:

- 1) Identificação de possíveis marcadores moleculares de disfunção respiratória na ELA, com valor preditivo no prognóstico, bem como com potencial de aplicação em futuros ensaios clínicos (CC-16, IL-6);

- 2) Necessidade de estudar de forma consistente o biomarcador inflamatório-pro-trombótico, o fibrinogénio γ' , na insuficiência respiratória associada à ELA;
- 3) Provável irrelevância da creatinina como indicador da evolução respiratória na ELA;
- 4) Identificação de alterações na elasticidade/rigidez dos eritrócitos e das suas propriedades morfológicas, cujo eventual impacto na hipóxia periférica é incerto.

Os resultados encontrados no âmbito da tese, são muito promissores no contexto dos objectivos específicos deste projecto. No entanto, uma parte destes resultados, foram obtidos num pequeno grupo de doentes. Assim, é essencial ampliar a população estudada e investigar de forma sistemática um conjunto mais amplo de parâmetros, em particular quanto à função respiratória, de forma longitudinal. Somente desta forma podemos atingir plenamente os principais objectivos deste projecto.

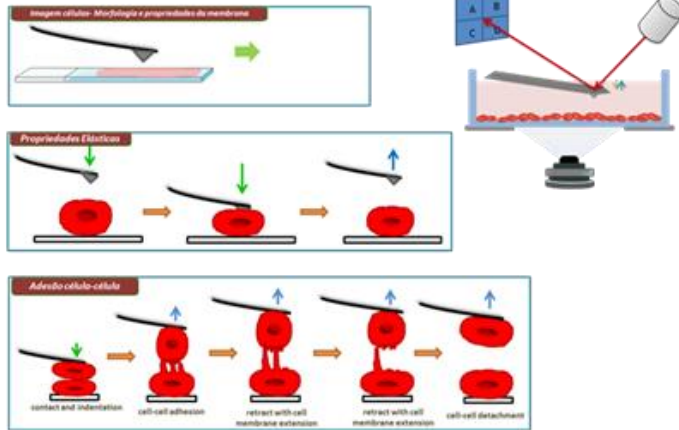
A nossa tese não esclarece de forma satisfatória a interacção entre a inflamação, a insuficiência respiratória e o comportamento dos marcadores investigados, em particular relativamente aos eritrócitos e suas propriedades. Para dissecar estes processos e estabelecer o seu significado nesta doença, importa incluir uma população de controlo constituída por doentes com outras patologias neurodegenerativas e/ou neuromusculares.

Futuramente, pretende-se igualmente estudar de forma mais exhaustiva as características do eritrócito, nomeadamente as diferentes formas de hemoglobina e transporte de oxigénio nas amostras; estudar o valor da pressão parcial de O₂ para a qual a hemoglobina está saturada a 50% (P50) e a razão entre o glutatião oxidado (GSSG)/glutatião reduzido (GSH); incluindo outros biomarcadores inflamatórios, o perfil genético, os níveis plasmáticos de fibrinogénio γ' e fibrinogénio total. Deverão ser também investigadas as características moleculares da membrana dos eritrócitos, nomeadamente a quantificação da concentração de ácido siálico, estudos de lipidómica e do metabolismo do ferro.⁸⁰¹

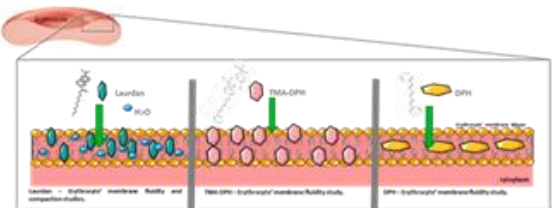
Este nosso modesto contributo e outros estudos, no futuro, poderão ser relevantes na identificação de novos biomarcadores para diferentes estadios da insuficiência

respiratória na doença da ELA (vd. Figura 42), de forma a propiciar um tratamento médico mais atempado e adaptado a cada doente.

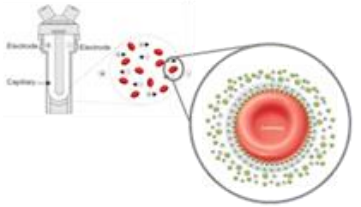
Microscopia de Força Atômica



Fluidez da membrana eritrocitária



Potencial Zeta-Eritrócitos



Quantificação de resíduos de ácido siálico

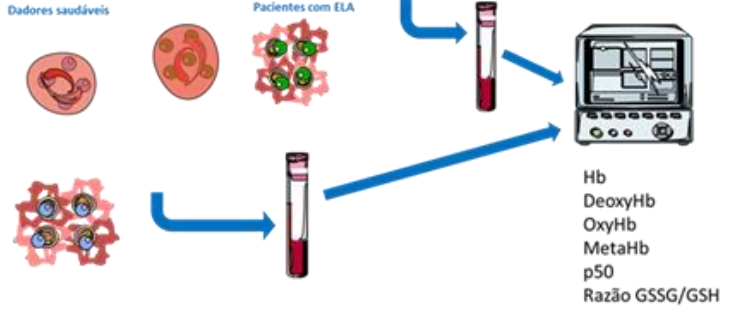
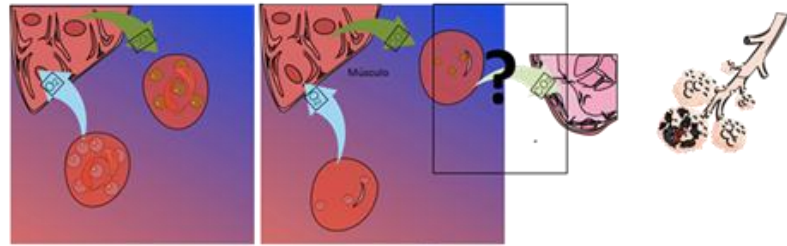
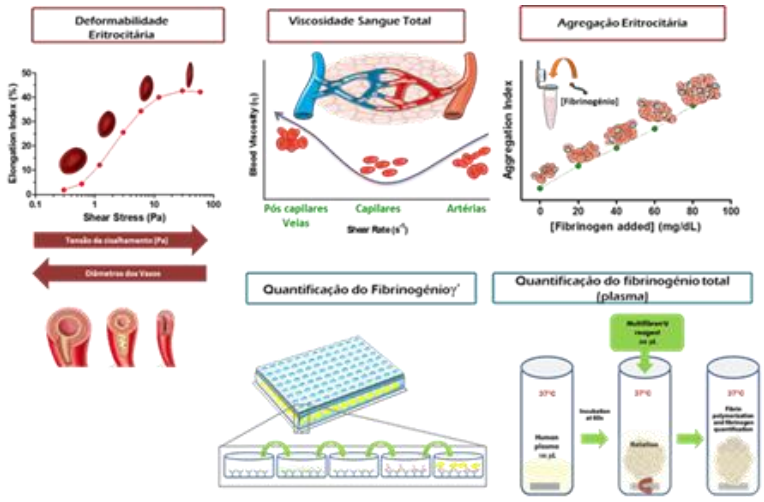
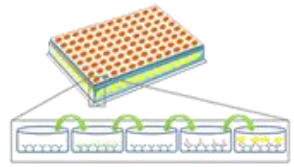
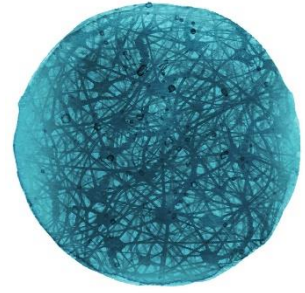


Figura 42 | Resumo das prespectivas futuras e os principais estudos e metodologias propostas para aplicação futura.

Pretende-se continuar a utilizar as mesmas técnicas, como o AFM, para os estudos da morfologia e propriedades da membrana eritrocitária; Estudar as propriedades elásticas dos eritrócitos por Espectroscopia de força; Estudar a fluidez da membrana e potencial zeta na superfície da membrana dos eritrócitos, bem como a quantificação de ácidos siálicos; Adicionalmente, pretendemos estudar as propriedades hemorreológicas do sangue, como a deformabilidade eritrocitária, agregação eritrocitária e a viscosidade do sangue total; quantificar a concentração plasmática de fibrinogénio total e fibrinogénio γ' , bem como o estudo do eritrócito de forma a avaliar da capacidade de transporte de oxigénio nos eritrócitos de pacientes com ELA, recorrendo a técnicas como o hemograma e estudar os diferentes tipos de hemoglobina, P50 e a razão GSSG/GSH.



BIBLIOGRAFIA

"And now for something completely different."

Monty Python

BIBLIOGRAFIA

1. Braun, A.T., Caballero-Eraso, C. & Lechtzin, N.J.C.i.c.m. Amyotrophic Lateral Sclerosis and the Respiratory System. **39**, 391-400 (2018).
2. Kiernan, M.C., *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis. **377**, 942-955 (2011).
3. Turner, M.R., *et al.* Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. **12**, 310-322 (2013).
4. Pronto-Laborinho, A.C., Pinto, S. & de Carvalho, M.J.B.r.i. Roles of vascular endothelial growth factor in amyotrophic lateral sclerosis. **2014**(2014).
5. Renton, A.E., Chiò, A. & Traynor, B.J.J.N.n. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. **17**, 17 (2014).
6. Jones, A.R., *et al.* Stratified gene expression analysis identifies major amyotrophic lateral sclerosis genes. **36**, 2006. e2001-2006. e2009 (2015).
7. DeJesus-Hernandez, M., *et al.* Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. **72**, 245-256 (2011).
8. Renton, A.E., *et al.* A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. **72**, 257-268 (2011).
9. Gromicho, M., *et al.* Frequency of C9orf72 hexanucleotide repeat expansion and SOD1 mutations in Portuguese patients with amyotrophic lateral sclerosis. **70**, 325. e327-325. e315 (2018).
10. Freischmidt, A., *et al.* Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia. **18**, 631 (2015).
11. Hardiman, O., *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis. **3**, 17071 (2017).
12. Kiernan, J. & Hudson, J.J.B. Frontal lobe atrophy in motor neuron diseases. **117**, 747-757 (1994).
13. Brown Jr, R.H. & Robberecht, W. Amyotrophic lateral sclerosis: pathogenesis. in *Seminars in neurology*, Vol. 21 131-140 (Copyright© 2001 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New ..., 2001).
14. Costa, J., Gomes, C., de Carvalho, M.J.C. & Targets, N.D.-D. Diagnosis, pathogenesis and therapeutic targets in amyotrophic lateral sclerosis. **9**, 764-778 (2010).
15. Beal, M.F. Mitochondria and the pathogenesis of ALS. (Oxford University Press, 2000).
16. Williamson, T.L. & Cleveland, D.W.J.N.n. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. **2**, 50 (1999).

17. Gonçalves, M., *et al.* Phosphoneurofilament heavy chain and vascular endothelial growth factor as cerebrospinal fluid biomarkers for ALS. **18**, 134-136 (2017).
18. Rothstein, J.D.J.C.n. Excitotoxicity and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. **3**, 348-359 (1995).
19. Hall, E.D., Oostveen, J.A. & Gurney, M.E.J.G. Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. **23**, 249-256 (1998).
20. Baines, K., Pavord, I., Gibson, P.J.T.I.J.o.T. & Disease, L. The role of biomarkers in the management of airways disease. **18**, 1264-1268 (2014).
21. Bhargava, M. & Wendt, C.H.J.T.R. Biomarkers in acute lung injury. **159**, 205-217 (2012).
22. Gonçalves, M., *et al.* Phosphoneurofilament heavy chain and N-glycomics from the cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis. **438**, 342-349 (2015).
23. Otto, M., *et al.* Roadmap and standard operating procedures for biobanking and discovery of neurochemical markers in ALS. **13**, 1-10 (2012).
24. Pinto, S. & Carvalho, M.d.J.N.d.m. Breathing new life into treatment advances for respiratory failure in amyotrophic lateral sclerosis patients. **4**, 83-102 (2014).
25. Pinto, S., Pinto, A. & de Carvalho, M.J.C.n. Phrenic nerve studies predict survival in amyotrophic lateral sclerosis. **123**, 2454-2459 (2012).
26. Pinto, S., Alves, P., Pimentel, B., Swash, M. & de Carvalho, M.J.C.N. Ultrasound for assessment of diaphragm in ALS. **127**, 892-897 (2016).
27. Meyer, K.C., *et al.* An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. **185**, 1004-1014 (2012).
28. Park, H.Y., *et al.* Club cell protein 16 and disease progression in chronic obstructive pulmonary disease. **188**, 1413-1419 (2013).
29. Shaw, J.G., *et al.* Biomarkers of progression of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **6**, 1532 (2014).
30. Ware, L.B., *et al.* Biomarkers of lung epithelial injury and inflammation distinguish severe sepsis patients with acute respiratory distress syndrome. **17**, R253 (2013).
31. Lock-Johansson, S., Vestbo, J. & Sorensen, G.L.J.R.r. Surfactant protein D, Club cell protein 16, Pulmonary and activation-regulated chemokine, C-reactive protein, and Fibrinogen biomarker variation in chronic obstructive lung disease. **15**, 147 (2014).
32. Bester, J. & Pretorius, E.J.S.r. Effects of IL-1 β , IL-6 and IL-8 on erythrocytes, platelets and clot viscoelasticity. **6**, 32188 (2016).
33. van Eijk, R.P., *et al.* Monitoring disease progression with plasma creatinine in amyotrophic lateral sclerosis clinical trials. **89**, 156-161 (2018).

34. Pretorius, E. & Kell, D.B.J.I.B. Diagnostic morphology: biophysical indicators for iron-driven inflammatory diseases. **6**, 486-510 (2014).
35. Cetin, A. & Sahin, M. A Monolithic Fluid-Structure Algorithm Applied to Buckling of Red Blood Cell Membrane.
36. Mannila, M.N., *et al.* Elevated plasma fibrinogen γ' concentration is associated with myocardial infarction: effects of variation in fibrinogen genes and environmental factors. **5**, 766-773 (2007).
37. Domingues, M.M., *et al.* Thrombin and fibrinogen γ' impact clot structure by marked effects on intrafibrillar structure and protofibril packing. **127**, 487-495 (2016).
38. Macrae, F.L., Domingues, M.M., Casini, A. & Ariens, R.A. The (Patho) physiology of Fibrinogen γ' . in *Seminars in thrombosis and hemostasis*, Vol. 42 344-355 (Thieme Medical Publishers, 2016).
39. Gladman, M., DeHaan, M., Pinto, H., Geerts, W. & Zinman, L.J.N. Venous thromboembolism in amyotrophic lateral sclerosis: a prospective study. **82**, 1674-1677 (2014).
40. Berry, J.D. & Korngut, L. Reevaluating the risk of DVT in people with ALS: Weak in the knees and DVTs. (AAN Enterprises, 2014).
41. Lovely, R.S., *et al.* γ' fibrinogen: evaluation of a new assay for study of associations with cardiovascular disease. **56**, 781-788 (2010).
42. Magnus, T., *et al.* Disease progression in amyotrophic lateral sclerosis: predictors of survival. **25**, 709-714 (2002).
43. Warschawski, D.E., *et al.* Choosing membrane mimetics for NMR structural studies of transmembrane proteins. **1808**, 1957-1974 (2011).
44. Bazzoni, G., Rasia, M.J.B.C., *Molecules, & Diseases*. Effects of an amphipathic drug on the rheological properties of the cell membrane. **24**, 552-559 (1998).
45. Franz, C., Puech, P.-H.J.C. & Bioengineering, M. Atomic force microscopy: a versatile tool for studying cell morphology, adhesion and mechanics. **1**, 289-300 (2008).
46. Dufre ne, Y.F. & Pelling, A.E.J.N. Force nanoscopy of cell mechanics and cell adhesion. **5**, 4094-4104 (2013).
47. M ller, D.J. & Dufrene, Y.F. Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology. in *Nanoscience And Technology: A Collection of Reviews from Nature Journals* 269-277 (World Scientific, 2010).
48. Dulińska, I., *et al.* Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy. **66**, 1-11 (2006).
49. Cross, S.E., Jin, Y.-S., Rao, J. & Gimzewski, J.K.J.N.n. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. **2**, 780 (2007).

50. Rowland, L.P.J.A.o.n. How amyotrophic lateral sclerosis got its name: the clinical-pathologic genius of Jean-Martin Charcot. **58**, 512-515 (2001).
51. Charcot, J.-M. & Joffroy, A. *Deux cas d'atrophie musculaire progressive: avec lésions de la substance grise et des faisceaux antérolatéraux de la moelle épinière*, (Masson, 1869).
52. Charcot, J.J.P.M. De la sclérose latérale amyotrophique. Leçons recueillies par Bourneville. **24**, 29-31 (1874).
53. Duchenne de Boulogne, G.J.C.R.S.A.S. Recherches électro-physiologiques et thérapeutiques. **32**, 506 (1851).
54. Wijesekera, L.C. & Leigh, P.N.J.O.j.o.r.d. Amyotrophic lateral sclerosis. **4**, 3 (2009).
55. Goetz, C.G.J.M. & Medicine, N.O.J.o.t.A.A.o.E. Amyotrophic lateral sclerosis: early contributions of Jean-Martin Charcot. **23**, 336-343 (2000).
56. Haverkamp, L.J., Appel, V. & Appel, S.H.J.B. Natural history of amyotrophic lateral sclerosis in a database population Validation of a scoring system and a model for survival prediction. **118**, 707-719 (1995).
57. Leigh, P.N., Ray-Chaudhuri, K.J.J.o.n., neurosurgery, & psychiatry. Motor neuron disease. **57**, 886 (1994).
58. Lord, B. & Walton, J. *Brain's diseases of the nervous system*. (London: Oxford University Press, 1969).
59. Ludolph, A., *et al.* A revision of the El Escorial criteria-2015. **16**, 291-292 (2015).
60. Rowland, L.P. & Shneider, N.A.J.N.E.J.o.M. Amyotrophic lateral sclerosis. **344**, 1688-1700 (2001).
61. Brown, R.H. & Al-Chalabi, A.J.N.E.J.o.M. Amyotrophic lateral sclerosis. **377**, 162-172 (2017).
62. van Es, M.A., *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis. **390**, 2084-2098 (2017).
63. Caress, J.B., *et al.* Natural history of muscle cramps in amyotrophic lateral sclerosis. **53**, 513-517 (2016).
64. Swinnen, B. & Robberecht, W.J.N.R.N. The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. **10**, 661 (2014).
65. Li, H.-F. & Wu, Z.-Y.J.T.n. Genotype-phenotype correlations of amyotrophic lateral sclerosis. **5**, 3 (2016).
66. Dupuis, L., Pradat, P.-F., Ludolph, A.C. & Loeffler, J.-P.J.T.L.N. Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. **10**, 75-82 (2011).
67. Moglia, C., *et al.* Influence of arterial hypertension, type 2 diabetes and cardiovascular risk factors on ALS outcome: a population-based study. **18**, 590-597 (2017).
68. Al-Chalabi, A., *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis: moving towards a new classification system. **15**, 1182-1194 (2016).

69. Mathis, S., *et al.* Management and therapeutic perspectives in amyotrophic lateral sclerosis. **17**, 263-276 (2017).
70. Hübers, A., *et al.* Amyotrophe Lateralsklerose. **87**, 179-188 (2016).
71. Elamin, M., *et al.* Executive dysfunction is a negative prognostic indicator in patients with ALS without dementia. **76**, 1263-1269 (2011).
72. Elamin, M., *et al.* Identifying behavioural changes in ALS: validation of the Beaumont Behavioural Inventory (BBI). **18**, 68-73 (2017).
73. Rooney, J.P. Doctoral Thesis, Trinity College Dublin.School of Medicine (2018).
74. Floeter, M.K. & Gendron, T.F.J.F.i.n. Biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia associated with hexanucleotide expansion mutations in C9orf72. **9**, 1063 (2018).
75. Spalloni, A., Longone, P.J.N. & Reviews, B. Cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis, clues from the SOD1 mouse. **60**, 12-25 (2016).
76. Zarei, S., *et al.* A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. **6**(2015).
77. Couratier, P., Torny, F. & Lacoste, M.J.R.N. Échelles fonctionnelles de la sclérose latérale amyotrophique. **162**, 502-507 (2006).
78. Lambert, E. & Mulder, D. Electromyographic studies in amyotrophic lateral sclerosis. in *Proceedings of the staff meetings. Mayo Clinic*, Vol. 32 441 (1957).
79. Brooks, B.R.J.J.o.t.n.s. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. **124**, 96-107 (1994).
80. Kiernan, M.C.J.T.M.J.o.A. Motor neurone disease: a Pandora's box. **178**, 311-312 (2003).
81. Traynor, B.J., *et al.* Clinical features of amyotrophic lateral sclerosis according to the El Escorial and Airlie House diagnostic criteria: A population-based study. **57**, 1171-1176 (2000).
82. Reniers, W., *et al.* Prognostic value of clinical and electrodiagnostic parameters at time of diagnosis in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **18**, 341-350 (2017).
83. Brooks, B.R., Miller, R.G., Swash, M., Munsat, T.L.J.A.i.s. & disorders, o.m.n. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. **1**, 293-299 (2000).
84. de Carvalho, M., *et al.* Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. **119**, 497-503 (2008).
85. Gordon, P.H., *et al.* Predicting survival of patients with amyotrophic lateral sclerosis at presentation: a 15-year experience. **12**, 81-90 (2013).
86. Byrne, S., *et al.* Rate of familial amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. **82**, 623-627 (2011).

87. Rooney, J., *et al.* Survival analysis of Irish amyotrophic lateral sclerosis patients diagnosed from 1995–2010. **8**, e74733 (2013).
88. Conde, D.B. & graduada de Pneumologia, A. Associação Portuguesa de Esclerose Lateral Amiotrófica.
89. Conde, B., Winck, J.C. & Azevedo, L.F.J.N. Estimating Amyotrophic Lateral Sclerosis and Motor Neuron Disease Prevalence in Portugal Using a Pharmacoepidemiological Approach and a Bayesian Multiparameter Evidence Synthesis Model. 1-11 (2019).
90. Logroscino, G., *et al.* Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: new evidence and unsolved issues. **79**, 6-11 (2008).
91. Logroscino, G., *et al.* Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. **81**, 385-390 (2010).
92. O'Toole, O., *et al.* Epidemiology and clinical features of amyotrophic lateral sclerosis in Ireland between 1995 and 2004. **79**, 30-32 (2008).
93. Van Weemen, B. & Schuurs, A.J.F.I. Immunoassay using antigen—enzyme conjugates. **15**, 232-236 (1971).
94. Al-Chalabi, A. & Hardiman, O.J.N.R.N. The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. **9**, 617 (2013).
95. Manjaly, Z.R., *et al.* The sex ratio in amyotrophic lateral sclerosis: a population based study. **11**, 439-442 (2010).
96. Armon, C.J.N. Smoking may be considered an established risk factor for sporadic ALS. **73**, 1693-1698 (2009).
97. Hardiman, O., *et al.* The changing picture of amyotrophic lateral sclerosis: lessons from European registers. **88**, 557-563 (2017).
98. Plato, C., *et al.* ALS and PDC of Guam: forty-year follow-up. **58**, 765-773 (2002).
99. Kihira, T., *et al.* An increase in ALS incidence on the Kii Peninsula, 1960– 2009: A possible link to change in drinking water source. **13**, 347-350 (2012).
100. Kuzuhara, S. & Kokubo, Y.J.M.d.o.j.o.t.M.D.S. Atypical parkinsonism of Japan: amyotrophic lateral sclerosis–parkinsonism–dementia complex of the Kii peninsula of Japan (Muro disease): an update. **20**, S108-S113 (2005).
101. Steele, J.C. & McGeer, P.L.J.N. The ALS/PDC syndrome of Guam and the cycad hypothesis. **70**, 1984-1990 (2008).
102. Kuzuhara, S., *et al.* Familial amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of the Kii Peninsula of Japan: clinical and neuropathological study and tau analysis. **49**, 501-511 (2001).
103. Ingre, C., Roos, P.M., Piehl, F., Kamel, F. & Fang, F.J.C.e. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. **7**, 181 (2015).

104. Murch, S., Cox, P., Banack, S., Steele, J. & Sacks, O.J.A.N.S. Occurrence of β -methylamino-l-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. **110**, 267-269 (2004).
105. Cox, P.A. & Sacks, O.W.J.N. Cycad neurotoxins, consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam. **58**, 956-959 (2002).
106. Alonso, A., Logroscino, G., Jick, S.S. & Hernán, M.A.J.E.j.o.n. Incidence and lifetime risk of motor neuron disease in the United Kingdom: a population-based study. **16**, 745-751 (2009).
107. Plato, C.C., *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of Guam: changing incidence rates during the past 60 years. **157**, 149-157 (2003).
108. Mimuro, M., Yoshida, M., Kuzuhara, S. & Kokubo, Y.J.N. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of the H ohara focus of the K ii P eninsula: A multiple proteinopathy? **38**, 98-107 (2018).
109. Bensimon, G., Lacomblez, L., Meininger, V.f. & Medicine, A.R.S.G.J.N.E.J.o. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. **330**, 585-591 (1994).
110. Rothstein, J.D.J.C. Edaravone: a new drug approved for ALS. **171**, 725 (2017).
111. Kumar, V., Islam, A., Hassan, M.I. & Ahmad, F.J.E.j.o.m.c. Therapeutic progress in amyotrophic lateral sclerosis-beginning to learning. **121**, 903-917 (2016).
112. Traynor, B.J., Alexander, M., Corr, B., Frost, E. & Hardiman, O.J.J.o.n. An outcome study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. **250**, 473-479 (2003).
113. Bensimon, G., *et al.* A study of riluzole in the treatment of advanced stage or elderly patients with amyotrophic lateral sclerosis. **249**, 609-615 (2002).
114. Bourke, S.C., *et al.* Effects of non-invasive ventilation on survival and quality of life in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised controlled trial. **5**, 140-147 (2006).
115. Diagnosis, E.T.F.o., *et al.* EFNS guidelines on the clinical management of amyotrophic lateral sclerosis (MALS)—revised report of an EFNS task force. **19**, 360-375 (2012).
116. Van den Berg, J., *et al.* Multidisciplinary ALS care improves quality of life in patients with ALS. **65**, 1264-1267 (2005).
117. Rooney, J., *et al.* A multidisciplinary clinic approach improves survival in ALS: a comparative study of ALS in Ireland and Northern Ireland. **86**, 496-501 (2015).
118. Miller, R.G., *et al.* Practice parameter update: the care of the patient with amyotrophic lateral sclerosis: drug, nutritional, and respiratory therapies (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. **73**, 1218-1226 (2009).

119. Andersen, P.M., *et al.* Good practice in the management of amyotrophic lateral sclerosis: Clinical guidelines. An evidence-based review with good practice points. EALSC Working Group. **8**, 195-213 (2007).
120. Leigh, P., *et al.* The management of motor neurone disease. **74**, iv32-iv47 (2003).
121. Armon, C.J.N. An evidence-based medicine approach to the evaluation of the role of exogenous risk factors in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **22**, 217-228 (2003).
122. Deivasigamani, S., Verma, H.K., Ueda, R., Ratnaparkhi, A. & Ratnaparkhi, G.S.J.B.o. A genetic screen identifies Tor as an interactor of VAPB in a Drosophila model of amyotrophic lateral sclerosis. **3**, 1127-1138 (2014).
123. He, J., Mangelsdorf, M., Fan, D., Bartlett, P. & Brown, M.A.J.T.N. Amyotrophic lateral sclerosis genetic studies: from genome-wide association mapping to genome sequencing. **21**, 599-615 (2015).
124. Al-Chalabi, A., Van Den Berg, L.H. & Veldink, J.J.N.R.N. Gene discovery in amyotrophic lateral sclerosis: implications for clinical management. **13**, 96 (2017).
125. Zou, Z.-Y., *et al.* Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. **88**, 540-549 (2017).
126. Pampalakis, G., *et al.* New molecular diagnostic trends and biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. **40**, 361-373 (2019).
127. Cruz, D.C., Nelson, L.M., McGuire, V. & Longstreth Jr, W.J.N. Physical trauma and family history of neurodegenerative diseases in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based case-control study. **18**, 101-110 (1999).
128. Kamel, F., Umbach, D.M., Munsat, T.L., Shefner, J.M. & Sandler, D.P.J.N. Association of cigarette smoking with amyotrophic lateral sclerosis. **18**, 194-202 (1999).
129. Al-Chalabi, A., *et al.* An estimate of amyotrophic lateral sclerosis heritability using twin data. **81**, 1324-1326 (2010).
130. Chia, R., Chiò, A. & Traynor, B.J.J.T.L.N. Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications. **17**, 94-102 (2018).
131. Nguyen, H.P., Van Broeckhoven, C. & van der Zee, J.J.T.i.G. ALS genes in the genomic era and their implications for FTD. **34**, 404-423 (2018).
132. Bowling, A.C., Schulz, J.B., Brown Jr, R.H. & Beal, M.F.J.J.o.n. Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **61**, 2322-2325 (1993).
133. Hadano, S., *et al.* A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. **29**, 166 (2001).
134. Hand, C.K., *et al.* A novel locus for familial amyotrophic lateral sclerosis, on chromosome 18q. **70**, 251-256 (2002).

135. Chance, P.F., *et al.* Linkage of the gene for an autosomal dominant form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 9q34. **62**, 633-640 (1998).
136. Orlacchio, A., *et al.* SPATACSIN mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis. **133**, 591-598 (2010).
137. Vance, C., *et al.* Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. **323**, 1208-1211 (2009).
138. Sapp, P.C., *et al.* Identification of two novel loci for dominantly inherited familial amyotrophic lateral sclerosis. **73**, 397-403 (2003).
139. Nishimura, A.L., *et al.* A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. **75**, 822-831 (2004).
140. Greenway, M.J., *et al.* ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis. **38**, 411 (2006).
141. Sreedharan, J., *et al.* TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **319**, 1668-1672 (2008).
142. Chow, C.Y., *et al.* Deleterious variants of FIG4, a phosphoinositide phosphatase, in patients with ALS. **84**, 85-88 (2009).
143. Maruyama, H., *et al.* Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. **465**, 223 (2010).
144. Elden, A.C., *et al.* Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. **466**, 1069 (2010).
145. Johnson, J.O., *et al.* Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. **68**, 857-864 (2010).
146. Deng, H.-X., *et al.* Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. **477**, 211 (2011).
147. Al-Saif, A., Al-Mohanna, F. & Bohlega, S.J.A.o.n. A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis. **70**, 913-919 (2011).
148. Parkinson, N., *et al.* ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). **67**, 1074-1077 (2006).
149. Wu, C.-H., *et al.* Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. **488**, 499 (2012).
150. Takahashi, Y., *et al.* ERBB4 mutations that disrupt the neuregulin-ErbB4 pathway cause amyotrophic lateral sclerosis type 19. **93**, 900-905 (2013).
151. Kim, H.J., *et al.* Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. **495**, 467 (2013).
152. Johnson, J.O., *et al.* Mutations in the Matrin 3 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. **17**, 664 (2014).

153. Smith, B.N., *et al.* Exome-wide rare variant analysis identifies TUBA4A mutations associated with familial ALS. **84**, 324-331 (2014).
154. Kenna, K.P., *et al.* NEK1 variants confer susceptibility to amyotrophic lateral sclerosis. **48**, 1037 (2016).
155. Nicolas, A., *et al.* Genome-wide analyses identify KIF5A as a novel ALS gene. **97**, 1268-1283. e1266 (2018).
156. Brenner, D., *et al.* Hot-spot KIF5A mutations cause familial ALS. **141**, 688-697 (2018).
157. Chaussenot, A., *et al.* Screening of CHCHD10 in a French cohort confirms the involvement of this gene in frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis patients. **35**, 2884. e2881-2884. e2884 (2014).
158. Fecto, F., *et al.* SQSTM1 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **68**, 1440-1446 (2011).
159. Cirulli, E.T., *et al.* Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. **347**, 1436-1441 (2015).
160. Williams, K.L., *et al.* CCFN mutations in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. **7**, 11253 (2016).
161. Simpson, C.L., *et al.* Variants of the elongator protein 3 (ELP3) gene are associated with motor neuron degeneration. **18**, 472-481 (2008).
162. Figlewicz, D.A., *et al.* Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. **3**, 1757-1761 (1994).
163. Puls, I., *et al.* Mutant dynactin in motor neuron disease. **33**, 455 (2003).
164. Mitchell, J., *et al.* Familial amyotrophic lateral sclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase. **107**, 7556-7561 (2010).
165. Couthouis, J., *et al.* A yeast functional screen predicts new candidate ALS disease genes. **108**, 20881-20890 (2011).
166. Kaneb, H.M., *et al.* Deleterious mutations in the essential mRNA metabolism factor, hGle1, in amyotrophic lateral sclerosis. **24**, 1363-1373 (2014).
167. Van Rheenen, W., *et al.* Genome-wide association analyses identify new risk variants and the genetic architecture of amyotrophic lateral sclerosis. **48**, 1043 (2016).
168. Mackenzie, I.R., *et al.* TIA1 mutations in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia promote phase separation and alter stress granule dynamics. **95**, 808-816. e809 (2017).
169. Alsultan, A.A., Waller, R., Heath, P.R., Kirby, J.J.D.n. & disease, n. The genetics of amyotrophic lateral sclerosis: current insights. **6**, 49 (2016).
170. Rosen, D.R., *et al.* Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. **362**, 59 (1993).

171. Chen, S., Sayana, P., Zhang, X. & Le, W.J.M.n. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update. **8**, 28 (2013).
172. Ferrari, R., Kapogiannis, D., D Huey, E. & Momeni, P.J.C.A.R. FTD and ALS: a tale of two diseases. **8**, 273-294 (2011).
173. Deng, H.-X., *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu, Zn superoxide dismutase. **261**, 1047-1051 (1993).
174. Cudkowicz, M., *et al.* Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. **41**, 210-221 (1997).
175. Pasinelli, P. & Brown, R.H.J.N.R.N. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. **7**, 710 (2006).
176. Andersen, P., *et al.* Autosomal recessive adult-onset amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for Asp90Ala CuZn-superoxide dismutase mutation: A clinical and genealogical study of 36 patients. **119**, 1153-1172 (1996).
177. Turner, M., *et al.* Distinct cerebral lesions in sporadic and 'D90A'SOD1 ALS: studies with [11C] flumazenil PET. **128**, 1323-1329 (2005).
178. Wang, H.-Y., Wang, I.-F., Bose, J. & Shen, C.-K.J.J.G. Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family. **83**, 130-139 (2004).
179. Scotter, E.L., Chen, H.-J. & Shaw, C.E.J.N. TDP-43 proteinopathy and ALS: insights into disease mechanisms and therapeutic targets. **12**, 352-363 (2015).
180. Buratti, E. & Baralle, F.E.J.R.b. The multiple roles of TDP-43 in pre-mRNA processing and gene expression regulation. **7**, 420-429 (2010).
181. Koppers, M., van Es, M., van den Berg, L.H., Veldink, J.H. & Pasterkamp, R.J. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis. in *Amyotrophic Lateral Sclerosis* (IntechOpen, 2012).
182. Da Cruz, S. & Cleveland, D.W.J.C.o.i.n. Understanding the role of TDP-43 and FUS/TLS in ALS and beyond. **21**, 904-919 (2011).
183. Arai, T., *et al.* TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. **351**, 602-611 (2006).
184. Neumann, M., *et al.* Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. **314**, 130-133 (2006).
185. Kabashi, E., *et al.* TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. **40**, 572 (2008).
186. Gitcho, M.A., *et al.* TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease. **63**, 535-538 (2008).
187. Corcia, P., *et al.* Phenotype and genotype analysis in amyotrophic lateral sclerosis with TARDBP gene mutations. **78**, 1519-1526 (2012).

188. Mackenzie, I.R., *et al.* Distinct pathological subtypes of FTLD-FUS. **121**, 207-218 (2011).
189. Olney, N.T., Spina, S. & Miller, B.L.J.N.c. Frontotemporal dementia. **35**, 339-374 (2017).
190. Crozat, A., Åman, P., Mandahl, N. & Ron, D.J.N. Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma. **363**, 640 (1993).
191. Perrotti, D., *et al.* TLS/FUS, a pro-oncogene involved in multiple chromosomal translocations, is a novel regulator of BCR/ABL-mediated leukemogenesis. **17**, 4442-4455 (1998).
192. Kovar, H.J.S. Dr. Jekyll and Mr. Hyde: the two faces of the FUS/EWS/TAF15 protein family. **2011**(2010).
193. Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M. & Cleveland, D.W.J.H.m.g. TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. **19**, R46-R64 (2010).
194. Valdmanis, P.N., Daoud, H., Dion, P.A., Rouleau, G.A.J.C.n. & reports, n. Recent advances in the genetics of amyotrophic lateral sclerosis. **9**, 198-205 (2009).
195. Doi, H., Koyano, S., Suzuki, Y., Nukina, N. & Kuroiwa, Y.J.N.r. The RNA-binding protein FUS/TLS is a common aggregate-interacting protein in polyglutamine diseases. **66**, 131-133 (2010).
196. Kabashi, E., *et al.* FUS and TARDBP but not SOD1 interact in genetic models of amyotrophic lateral sclerosis. **7**, e1002214 (2011).
197. Bäumer, D., *et al.* Juvenile ALS with basophilic inclusions is a FUS proteinopathy with FUS mutations. **75**, 611-618 (2010).
198. Kwiatkowski, T.J., *et al.* Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. **323**, 1205-1208 (2009).
199. Deng, H.X., *et al.* FUS-immunoreactive inclusions are a common feature in sporadic and non-SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis. **67**, 739-748 (2010).
200. Neumann, M., *et al.* A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. **132**, 2922-2931 (2009).
201. Urwin, H., *et al.* FUS pathology defines the majority of tau-and TDP-43-negative frontotemporal lobar degeneration. **120**, 33-41 (2010).
202. Huang, C., *et al.* FUS transgenic rats develop the phenotypes of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. **7**, e1002011 (2011).
203. Mackenzie, I.R., Rademakers, R. & Neumann, M.J.T.L.N. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. **9**, 995-1007 (2010).
204. Chi, S., Jiang, T., Tan, L., Yu, J.-T.J.N. & Reviews, B. Distinct neurological disorders with C9orf72 mutations: genetics, pathogenesis, and therapy. **66**, 127-142 (2016).

205. Majounie, E., *et al.* Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study.
206. Ji, A.-L., Zhang, X., Chen, W.-W. & Huang, W.-J.J.J.o.m.g. Genetics insight into the amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia spectrum. **54**, 145-154 (2017).
207. Butti, Z. & Patten, S.A.J.F.i.g. RNA Dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. **9**(2018).
208. Yanagi, K.S., *et al.* Meta-analysis of Genetic Modifiers Reveals Candidate Dysregulated Pathways in Amyotrophic Lateral Sclerosis. **396**, A3-A20 (2019).
209. Boeve, B.F., *et al.* Characterization of frontotemporal dementia and/or amyotrophic lateral sclerosis associated with the GGGGCC repeat expansion in C9ORF72. **135**, 765-783 (2012).
210. Snowden, J.S., *et al.* Distinct clinical and pathological characteristics of frontotemporal dementia associated with C 9ORF72 mutations. **135**, 693-708 (2012).
211. Gijssels, I., *et al.* A C9orf72 promoter repeat expansion in a Flanders-Belgian cohort with disorders of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum: a gene identification study. **11**, 54-65 (2012).
212. Miltenberger-Miltenyi, G., *et al.* C9orf72 expansion is associated with accelerated decline of respiratory function and decreased survival in amyotrophic lateral sclerosis. **90**, 118-120 (2019).
213. Mori, K., *et al.* The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTL/ALS. **339**, 1335-1338 (2013).
214. Vu, L.T. & Bowser, R.J.N. Fluid-based biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. **14**, 119-134 (2017).
215. May, S., *et al.* C9orf72 FTL/ALS-associated Gly-Ala dipeptide repeat proteins cause neuronal toxicity and Unc119 sequestration. **128**, 485-503 (2014).
216. Xiao, S., *et al.* Isoform-specific antibodies reveal distinct subcellular localizations of C 9orf72 in amyotrophic lateral sclerosis. **78**, 568-583 (2015).
217. Jovičić, A., *et al.* Modifiers of C9orf72 dipeptide repeat toxicity connect nucleocytoplasmic transport defects to FTD/ALS. **18**, 1226 (2015).
218. Zhang, K., *et al.* The C9orf72 repeat expansion disrupts nucleocytoplasmic transport. **525**, 56 (2015).
219. Corriero, A. & Horvitz, H.R.J.C.B. A C9orf72 ALS/FTD ortholog acts in endolysosomal degradation and lysosomal homeostasis. **28**, 1522-1535. e1525 (2018).
220. Babić Leko, M., *et al.* Molecular mechanisms of neurodegeneration related to C9orf72 hexanucleotide repeat expansion. **2019**(2019).

221. Ash, P.E., *et al.* Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. **77**, 639-646 (2013).
222. Nassif, M., Woehlbier, U. & Manque, P.A.J.F.i.n. The enigmatic role of C9ORF72 in autophagy. **11**, 442 (2017).
223. Gitler, A.D. & Tsuiji, H.J.B.r. There has been an awakening: emerging mechanisms of C9orf72 mutations in FTD/ALS. **1647**, 19-29 (2016).
224. Balendra, R. & Isaacs, A.M.J.N.R.N. C9orf72-mediated ALS and FTD: multiple pathways to disease. **1** (2018).
225. Van Blitterswijk, M., *et al.* Association between repeat sizes and clinical and pathological characteristics in carriers of C9ORF72 repeat expansions (Xpansize-72): a cross-sectional cohort study. **12**, 978-988 (2013).
226. Helgason, E., Phung, Q.T. & Dueber, E.C.J.F.I. Recent insights into the complexity of Tank-binding kinase 1 signaling networks: the emerging role of cellular localization in the activation and substrate specificity of TBK1. **587**, 1230-1237 (2013).
227. Oakes, J.A., Davies, M.C. & Collins, M.O.J.M.b. TBK1: a new player in ALS linking autophagy and neuroinflammation. **10**, 5 (2017).
228. Freischmidt, A., Müller, K., Ludolph, A.C., Weishaupt, J.H. & Andersen, P.M.J.J.n. Association of mutations in TBK1 with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. **74**, 110-113 (2017).
229. Cui, R., Tuo, M., Li, P. & Zhou, C.J.N.S. Association between TBK1 mutations and risk of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia spectrum: a meta-analysis. **39**, 811-820 (2018).
230. Costa, M., Gromicho, M., Pronto-Laborinho, A., Miltenberger, M.G. & de Carvalho, M.J.J.o.t.n.s. Novel TBK1 LoF variant in a family with upper motor neuron predominant motor neuron disease. **403**, 117 (2019).
231. Finkel, N.J.A.N. A forma pseudomiopática tardia da atrofia muscular progressiva heredo-familial. **20**, 307-322 (1962).
232. Richieri-Costa, A., *et al.* Autosomal dominant late adult spinal muscular atrophy, type Finkel. **9**, 119-128 (1981).
233. Weisskopf, M., *et al.* Prospective study of cigarette smoking and amyotrophic lateral sclerosis. **160**, 26-33 (2004).
234. Gallo, V., Bueno-De-Mesquita, H. B., Vermeulen, R., Andersen, P. M., Kyrozis, A., Linseisen, J., ... & Peeters, P. H. Smoking and risk for amyotrophic lateral sclerosis: analysis of the EPIC cohort. *Annals of neurology* **65(4)**, 378-385 (2009).
235. Fang, F., Bellocco, R., Hernán, M.A. & Ye, W.J.N. Smoking, snuff dipping and the risk of amyotrophic lateral sclerosis—a prospective cohort study. **27**, 217-221 (2006).

236. Calvo, A., Canosa, A., Bertuzzo, D., Cugnasco, P., Solero, L., Clerico, M., ... & Manera, U. Influence of cigarette smoking on ALS outcome: a population-based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **87(11)**, 1229-1233. (2016).
237. Okamoto, K., *et al.* Lifestyle factors and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a case-control study in Japan. **19**, 359-364 (2009).
238. Gallo, V., *et al.* Prediagnostic body fat and risk of death from amyotrophic lateral sclerosis: the EPIC cohort. **80**, 829-838 (2013).
239. Roos, P.M., *et al.* Manganese in cerebrospinal fluid and blood plasma of patients with amyotrophic lateral sclerosis. **237**, 803-810 (2012).
240. Veldink, J.H., *et al.* Intake of polyunsaturated fatty acids and vitamin E reduces the risk of developing amyotrophic lateral sclerosis. **78**, 367-371 (2007).
241. Okamoto, K., *et al.* Nutritional status and risk of amyotrophic lateral sclerosis in Japan. **8**, 300-304 (2007).
242. Fitzgerald, K.C., *et al.* Dietary ω -3 polyunsaturated fatty acid intake and risk for amyotrophic lateral sclerosis. **71**, 1102-1110 (2014).
243. Wang, Z.-J., Li, G.-M., Nie, B.-M., Lu, Y. & Yin, M.J.C.-b.i. Neuroprotective effect of the stearic acid against oxidative stress via phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **160**, 80-87 (2006).
244. Pérez, J., *et al.* Dietary fat and protein interact in suppressing neuropathic pain-related disorders following a partial sciatic ligation injury in rats. **111**, 297-305 (2004).
245. Russo, A., *et al.* Free radical scavenging capacity and protective effect of *Bacopa monniera* L. on DNA damage. **17**, 870-875 (2003).
246. Beghi, E., *et al.* Coffee and amyotrophic lateral sclerosis: a possible preventive role. **174**, 1002-1008 (2011).
247. Morozova, N., *et al.* Diet and amyotrophic lateral sclerosis. **19**, 324-337 (2008).
248. De Jong, S.W., *et al.* Smoking, alcohol consumption, and the risk of amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. **176**, 233-239 (2012).
249. Nelson, L.M., Valerie McGuire, W. T. Longstreth Jr, and Chantal Matkin. Population-based case-control study of amyotrophic lateral sclerosis in western Washington State. I. Cigarette smoking and alcohol consumption. *American journal of epidemiology* **151**, no. 2, 156-163 (2000).
250. Hamidou, B., *et al.* Epidemiological evidence that physical activity is not a risk factor for ALS. **29**, 459-475 (2014).
251. Harwood, C.A., *et al.* Long-term physical activity: an exogenous risk factor for sporadic amyotrophic lateral sclerosis? **17**, 377-384 (2016).

252. Chio, A., Gianmartino Benzi, Maurizia Dossena, Roberto Mutani, and Gabriele Mora. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain* **128**, no. 3 472-476 (2005).
253. Longstreth, W., McGuire, V., Koepsell, T., Wang, Y. & Van Belle, G.J.A.o.n. Risk of amyotrophic lateral sclerosis and history of physical activity: a population-based case-control study. **55**, 201-206 (1998).
254. Armon, C. Sports and trauma in amyotrophic lateral sclerosis revisited. *Journal of the neurological sciences* **262**, no. 1-2 45-53. (2007).
255. Peters, M.E., *et al.* Head injury serum markers for assessing response to trauma: design of the HeadSMART study. **31**, 370-378 (2017).
256. Binazzi, A., *et al.* An exploratory case-control study on spinal and bulbar forms of amyotrophic lateral sclerosis in the province of Rome. **10**, 361-369 (2009).
257. Beghi, G.L., Anna Micheli, Andrea Millul, Michele Perini, Riccardo Riva, Fabrizio Salmoiraghi, Eugenio Vitelli, Ettore %J Amyotrophic Lateral Sclerosis & Disorders, O.M.N. Validity of hospital discharge diagnoses for the assessment of the prevalence and incidence of amyotrophic lateral sclerosis. **2**, 99-104 (2001).
258. Goldman, S.M., *et al.* Head injury and Parkinson's disease risk in twins. **60**, 65-72 (2006).
259. Sutedja, N.A., *et al.* Exposure to chemicals and metals and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. **10**, 302-309 (2009).
260. Callaghan, B., Feldman, D., Gruis, K. & Feldman, E.J.N.D. The association of exposure to lead, mercury, and selenium and the development of amyotrophic lateral sclerosis and the epigenetic implications. **8**, 1-8 (2011).
261. Dobson, A.W., Erikson, K.M. & Aschner, M.J.A.-N.Y.A.O.S. Manganese neurotoxicity. 115-128 (2004).
262. Taysi, S., *et al.* Increased oxidant stress and decreased antioxidant status in erythrocytes of rats fed with zinc-deficient diet. **123**, 161-167 (2008).
263. Ellingsen, D.G., *et al.* A neurobehavioral study of current and former welders exposed to manganese. **29**, 48-59 (2008).
264. Kamel, F., *et al.* Lead exposure as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis. **2**, 195-201 (2005).
265. DEAPEN, D.M. & HENDERSON, B.E.J.A.J.o.E. A case-control study of amyotrophic lateral sclerosis. **123**, 790-799 (1986).
266. McGuire, V., *et al.* Occupational exposures and amyotrophic lateral sclerosis. A population-based case-control study. **145**, 1076-1088 (1997).

267. Gunnarsson, L.-G., Bodin, L., Söderfeldt, B., Axelson, O.J.O. & Medicine, E. A case-control study of motor neurone disease: its relation to heritability, and occupational exposures, particularly to solvents. **49**, 791-798 (1992).
268. Campbell, A., Williams, E., Barltrop, D.J.J.o.N., Neurosurgery & Psychiatry. Motor neurone disease and exposure to lead. **33**, 877-885 (1970).
269. Pierce-Ruhland, R. & Patten, B.J.A.o.c.r. Repeat study of antecedent events in motor neuron disease. **13**, 102-107 (1981).
270. Gresham, L.S., Molgaard, C.A., Golbeck, A.L. & Smith, R.J.N. Amyotrophic lateral sclerosis and occupational heavy metal exposure: a case-control study. **5**, 29-38 (1986).
271. Kamel, F., *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis, lead, and genetic susceptibility: polymorphisms in the delta-aminolevulinic acid dehydratase and vitamin D receptor genes. **111**, 1335-1339 (2003).
272. Kamel, F., *et al.* Lead exposure and amyotrophic lateral sclerosis. 311-319 (2002).
273. Albers, K., *et al.* Lead exposure and amyotrophic lateral sclerosis in a Northern California population. **33**, 74 (2009).
274. Dusek, P., *et al.* The neurotoxicity of iron, copper and manganese in Parkinson's and Wilson's diseases. **31**, 193-203 (2015).
275. Kilness, A.W. & Hochberg, F.H.J.J. Amyotrophic lateral sclerosis in a high selenium environment. **237**, 2843-2844 (1977).
276. Vinceti, M., Bonvicini, F., Rothman, K.J., Vescovi, L. & Wang, F.J.E.H. The relation between amyotrophic lateral sclerosis and inorganic selenium in drinking water: a population-based case-control study. **9**, 77 (2010).
277. Vinceti, M., *et al.* Cerebrospinal fluid of newly diagnosed amyotrophic lateral sclerosis patients exhibits abnormal levels of selenium species including elevated selenite. **38**, 25-32 (2013).
278. Roos, P.M., Vesterberg, O., Syversen, T., Flaten, T.P. & Nordberg, M.J.B.t.e.r. Metal concentrations in cerebrospinal fluid and blood plasma from patients with amyotrophic lateral sclerosis. **151**, 159-170 (2013).
279. Feychting, M., Jonsson, F., Pedersen, N.L. & Ahlbom, A.J.E. Occupational magnetic field exposure and neurodegenerative disease. **14**, 413-419 (2003).
280. Gunnarsson, L.-G. & Bodin, L. *Systematiska kunskapsöversikter;: 7. Epidemiologiskt påvisade samband mellan Amyotrofisk Lateral Skleros (ALS) och faktorer i arbetsmiljön*, (Göteborgs universitet, 2014).
281. Fang, F., *et al.* Workplace exposures and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. **117**, 1387-1392 (2009).

282. Andrew, A.S., *et al.* Environmental and occupational exposures and amyotrophic lateral sclerosis in New England. **17**, 110-116 (2017).
283. Beard, J.D. & Kamel, F.J.E.r. Military service, deployments, and exposures in relation to amyotrophic lateral sclerosis etiology and survival. **37**, 55-70 (2014).
284. Abhinav, K., Al-Chalabi, A., Hortobagyi, T., Leigh, P.N.J.J.o.N., Neurosurgery & Psychiatry. Electrical injury and amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the literature. **78**, 450-453 (2007).
285. Kheifets, L., *et al.* Future needs of occupational epidemiology of extremely low frequency electric and magnetic fields: review and recommendations. **66**, 72-80 (2009).
286. Vergara, X., *et al.* Occupational exposure to extremely low-frequency magnetic fields and neurodegenerative disease: a meta-analysis. **55**, 135-146 (2013).
287. Bonvicini, F., Marcello, N., Mandrioli, J., Pietrini, V. & Vinceti, M.J.A.d.I.s.d.s. Exposure to pesticides and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a population-based case-control study. **46**, 284-287 (2010).
288. Savettieri, G., *et al.* A case-control study of amyotrophic lateral sclerosis. **10**, 242-245 (1991).
289. Kamel, F., *et al.* Pesticide exposure and amyotrophic lateral sclerosis. **33**, 457-462 (2012).
290. Malek, A.M., Barchowsky, A., Bowser, R., Youk, A. & Talbott, E.O.J.E.r. Pesticide exposure as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis of epidemiological studies: pesticide exposure as a risk factor for ALS. **117**, 112-119 (2012).
291. Kang, H., Cha, E.S., Choi, G.J. & Lee, W.J.J.J.o.k.m.s. Amyotrophic lateral sclerosis and agricultural environments: a systematic review. **29**, 1610-1617 (2014).
292. Belbasis, L., Bellou, V. & Evangelou, E.J.N. Environmental risk factors and amyotrophic lateral sclerosis: an umbrella review and critical assessment of current evidence from systematic reviews and meta-analyses of observational studies. **46**, 96-105 (2016).
293. Chen, H., Richard, M., Sandler, D.P., Umbach, D.M. & Kamel, F.J.A.j.o.e. Head injury and amyotrophic lateral sclerosis. **166**, 810-816 (2007).
294. Pupillo, E., *et al.* Trauma and amyotrophic lateral sclerosis: a case-control study from a population-based registry. **19**, 1509-1517 (2012).
295. Peters, T.L., *et al.* Severe head injury and amyotrophic lateral sclerosis. **14**, 267-272 (2013).
296. Desport, J.C., *et al.* Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **74**, 328-334 (2001).

297. Lekoubou, A., Matsha, T.E., Sobngwi, E. & Kengne, A.P.J.B.r.n. Effects of diabetes mellitus on amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. **7**, 171 (2014).
298. Turner, M.R., Goldacre, R., Ramagopalan, S., Talbot, K. & Goldacre, M.J.J.N. Autoimmune disease preceding amyotrophic lateral sclerosis: an epidemiologic study. **81**, 1222-1225 (2013).
299. Zheng, Z., Sheng, L., Shang, H.J.A.L.S. & Degeneration, F. Statins and amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. **14**, 241-245 (2013).
300. Plun-Favreau, H., Lewis, P.A., Hardy, J., Martins, L.M. & Wood, N.W.J.P.g. Cancer and neurodegeneration: between the devil and the deep blue sea. **6**, e1001257 (2010).
301. Tabarés-Seisdedos, R. & Rubenstein, J.L.J.N.R.N. Inverse cancer comorbidity: a serendipitous opportunity to gain insight into CNS disorders. **14**, 293 (2013).
302. Sadot, E., *et al.* Breast cancer and motor neuron disease: clinical study of seven cases. **8**, 288-291 (2007).
303. Fang, F., *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis and cancer: a register-based study in Sweden. **14**, 362-368 (2013).
304. Freedman, D.M., *et al.* The risk of amyotrophic lateral sclerosis after cancer in US elderly adults: A population-based prospective study. **135**, 1745-1750 (2014).
305. Ismail, A., *et al.* Concurrence of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis in patients with hexanucleotide repeat expansions of C9ORF72. **84**, 79-87 (2013).
306. Eisen, A.J.J.o.c.n. Amyotrophic lateral sclerosis: a 40-year personal perspective. **16**, 505-512 (2009).
307. Sreedharan, J. & Brown Jr, R.H.J.A.o.n. Amyotrophic lateral sclerosis: problems and prospects. **74**, 309-316 (2013).
308. Bradley, W.G. & Mash, D.C.J.A.L.S. Beyond Guam: the cyanobacteria/BMAA hypothesis of the cause of ALS and other neurodegenerative diseases. **10**, 7-20 (2009).
309. Banack, S.A. & Cox, P.A.J.N. Biomagnification of cycad neurotoxins in flying foxes: implications for ALS-PDC in Guam. **61**, 387-389 (2003).
310. Cox, P.A., Banack, S.A. & Murch, S.J.J.P.o.t.N.A.o.S. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. **100**, 13380-13383 (2003).
311. Bienfang, P., *et al.* Prominent human health impacts from several marine microbes: history, ecology, and public health implications. **2011**(2010).
312. Van Blitterswijk, M., *et al.* Evidence for an oligogenic basis of amyotrophic lateral sclerosis. **21**, 3776-3784 (2012).

313. Robberecht, W. & Philips, T.J.N.R.N. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. **14**, 248 (2013).
314. Taylor, J.P., Brown Jr, R.H. & Cleveland, D.W.J.N. Decoding ALS: from genes to mechanism. **539**, 197 (2016).
315. Ferraiuolo, L., Kirby, J., Grierson, A.J., Sendtner, M. & Shaw, P.J.J.N.R.N. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. **7**, 616 (2011).
316. Therrien, M., Dion, P.A., Rouleau, G.A.J.C.n. & reports, n. ALS: recent developments from genetics studies. **16**, 59 (2016).
317. Morgan, S. & Orrell, R.W.J.B.m.b. Pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. **119**, 87-97 (2016).
318. Weishaupt, J.H., Hyman, T. & Dikic, I.J.T.i.m.m. Common molecular pathways in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. **22**, 769-783 (2016).
319. Rothstein, J.D., *et al.* Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. **38**, 73-84 (1995).
320. King, A.E., Woodhouse, A., Kirkcaldie, M.T. & Vickers, J.C.J.E.n. Excitotoxicity in ALS: overstimulation, or overreaction? **275**, 162-171 (2016).
321. Doble, A.J.N. The pharmacology and mechanism of action of riluzole. **47**, 233S-241S (1996).
322. Barber, S.C., Shaw, P.J.J.F.R.B. & Medicine. Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. **48**, 629-641 (2010).
323. Indo, H.P., *et al.* Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. **7**, 106-118 (2007).
324. Finelli, M.J., Sanchez-Pulido, L., Liu, K.X., Davies, K.E. & Oliver, P.L.J.J.o.B.C. The evolutionarily conserved Tre2/Bub2/Cdc16 (TBC), lysin motif (LysM), domain catalytic (TLDC) domain is neuroprotective against oxidative stress. **291**, 2751-2763 (2016).
325. Turner, M.R., Kiernan, M.C., Leigh, P.N. & Talbot, K.J.T.L.N. Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. **8**, 94-109 (2009).
326. Mitsumoto, H., *et al.* Oxidative stress biomarkers in sporadic ALS. **9**, 177-183 (2008).
327. Finelli, M.J., Liu, K.X., Wu, Y., Oliver, P.L. & Davies, K.E.J.H.m.g. Oxr1 improves pathogenic cellular features of ALS-associated FUS and TDP-43 mutations. **24**, 3529-3544 (2015).
328. Barber, S.C., Mead, R.J. & Shaw, P.J.J.B.e.B.A.-M.B.o.D. Oxidative stress in ALS: a mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. **1762**, 1051-1067 (2006).
329. Manfredi, G. & Xu, Z.J.M. Mitochondrial dysfunction and its role in motor neuron degeneration in ALS. **5**, 77-87 (2005).
330. Velde, C.V., *et al.* Misfolded SOD1 associated with motor neuron mitochondria alters mitochondrial shape and distribution prior to clinical onset. **6**, e22031 (2011).

331. Magrane, J., Cortez, C., Gan, W.-B. & Manfredi, G.J.H.m.g. Abnormal mitochondrial transport and morphology are common pathological denominators in SOD1 and TDP43 ALS mouse models. **23**, 1413-1424 (2013).
332. Higgins, C.M., Jung, C. & Xu, Z.J.B.n. ALS-associated mutant SOD1 G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. **4**, 16 (2003).
333. Parone, P.A., *et al.* Enhancing mitochondrial calcium buffering capacity reduces aggregation of misfolded SOD1 and motor neuron cell death without extending survival in mouse models of inherited amyotrophic lateral sclerosis. **33**, 4657-4671 (2013).
334. De Vos, K.J., *et al.* VAPB interacts with the mitochondrial protein PTPIP51 to regulate calcium homeostasis. **21**, 1299-1311 (2011).
335. Stoica, R., *et al.* ALS/FTD-associated FUS activates GSK-3 β to disrupt the VAPB–PTPIP51 interaction and ER–mitochondria associations. **17**, 1326-1342 (2016).
336. Stoica, R., *et al.* ER–mitochondria associations are regulated by the VAPB–PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. **5**, 3996 (2014).
337. Genin, E.C., *et al.* CHCHD10 mutations promote loss of mitochondrial cristae junctions with impaired mitochondrial genome maintenance and inhibition of apoptosis. **8**, 58-72 (2016).
338. Lopez-Gonzalez, R., *et al.* Poly (GR) in C9ORF72-related ALS/FTD compromises mitochondrial function and increases oxidative stress and DNA damage in iPSC-derived motor neurons. **92**, 383-391 (2016).
339. Naumann, M., *et al.* Impaired DNA damage response signaling by FUS-NLS mutations leads to neurodegeneration and FUS aggregate formation. **9**, 335 (2018).
340. Farg, M.A., Konopka, A., Soo, K.Y., Ito, D. & Atkin, J.D.J.H.m.g. The DNA damage response (DDR) is induced by the C9orf72 repeat expansion in amyotrophic lateral sclerosis. **26**, 2882-2896 (2017).
341. Conicella, A.E., Zerze, G.H., Mittal, J. & Fawzi, N.L.J.S. ALS mutations disrupt phase separation mediated by α -helical structure in the TDP-43 low-complexity C-terminal domain. **24**, 1537-1549 (2016).
342. Zhou, Y., Liu, S., Öztürk, A. & Hicks, G.G.J.R.d. FUS-regulated RNA metabolism and DNA damage repair: Implications for amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia pathogenesis. **2**, e1003895 (2014).
343. Amlie-Wolf, A., *et al.* Transcriptomic changes due to cytoplasmic TDP-43 expression reveal dysregulation of histone transcripts and nuclear chromatin. **10**, e0141836 (2015).

344. Chan, Y.A., Hieter, P. & Stirling, P.C.J.T.i.G. Mechanisms of genome instability induced by RNA-processing defects. **30**, 245-253 (2014).
345. Pizzo, E., *et al.* Ribonuclease/angiogenin inhibitor 1 regulates stress-induced subcellular localization of angiogenin to control growth and survival. **126**, 4308-4319 (2013).
346. Saxena, S., Rybak, S., Davey, R., Youle, R. & Ackerman, E.J.J.o.B.C. Angiogenin is a cytotoxic, tRNA-specific ribonuclease in the RNase A superfamily. **267**, 21982-21986 (1992).
347. Kapeli, K., *et al.* Distinct and shared functions of ALS-associated proteins TDP-43, FUS and TAF15 revealed by multisystem analyses. **7**, 12143 (2016).
348. Jaronen, M., Goldsteins, G. & Koistinaho, J.J.F.i.c.n. ER stress and unfolded protein response in amyotrophic lateral sclerosis—a controversial role of protein disulphide isomerase. **8**, 402 (2014).
349. Nishitoh, H., *et al.* ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress-and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. **22**, 1451-1464 (2008).
350. De Vos, K.J. & Hafezparast, M.J.N.o.d. Neurobiology of axonal transport defects in motor neuron diseases: opportunities for translational research? **105**, 283-299 (2017).
351. Perlson, E., *et al.* A switch in retrograde signaling from survival to stress in rapid-onset neurodegeneration. **29**, 9903-9917 (2009).
352. Gill, S.R., *et al.* Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. **115**, 1639-1650 (1991).
353. Blokhuis, A.M., Groen, E.J., Koppers, M., van den Berg, L.H. & Pasterkamp, R.J.J.A.n. Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. **125**, 777-794 (2013).
354. Ilieva, H., Polymenidou, M. & Cleveland, D.W.J.T.J.o.c.b. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. **187**, 761-772 (2009).
355. Komine, O. & Yamanaka, K.J.N.j.o.m.s. Neuroinflammation in motor neuron disease. **77**, 537 (2015).
356. Corcia, P., *et al.* Molecular imaging of microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis. **7**, e52941 (2012).
357. Appel, S.H., Zhao, W., Beers, D. & Henkel, J.J.A.M. The microglial-motoneuron dialogue in ALS. **30**, 4 (2011).
358. Blasco, H.I.n., *et al.* Metabolomics in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis: an untargeted approach via high-resolution mass spectrometry. **12**, 3746-3754 (2013).
359. Liu, J. & Wang, F.J.F.i.i. Role of neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: cellular mechanisms and therapeutic implications. **8**, 1005 (2017).

360. Liao, B., Zhao, W., Beers, D.R., Henkel, J.S. & Appel, S.H.J.E.n. Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. **237**, 147-152 (2012).
361. Beers, D.R., *et al.* Neuroinflammation modulates distinct regional and temporal clinical responses in ALS mice. **25**, 1025-1035 (2011).
362. Howland, D.S., *et al.* Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). **99**, 1604-1609 (2002).
363. Papadeas, S.T., Kraig, S.E., O'Banion, C., Lepore, A.C. & Maragakis, N.J.J.P.o.t.N.A.o.S. Astrocytes carrying the superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) mutation induce wild-type motor neuron degeneration in vivo. **108**, 17803-17808 (2011).
364. Pardo, A.C., *et al.* Loss of the astrocyte glutamate transporter GLT1 modifies disease in SOD1G93A mice. **201**, 120-130 (2006).
365. Dunlop, J., McIlvain, H.B., She, Y. & Howland, D.S.J.J.o.N. Impaired spinal cord glutamate transport capacity and reduced sensitivity to riluzole in a transgenic superoxide dismutase mutant rat model of amyotrophic lateral sclerosis. **23**, 1688-1696 (2003).
366. Cassina, P., *et al.* Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. **28**, 4115-4122 (2008).
367. Marchetto, M.C., *et al.* Non-cell-autonomous effect of human SOD1G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. **3**, 649-657 (2008).
368. Ferraiuolo, L., *et al.* Dysregulation of astrocyte–motoneuron cross-talk in mutant superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis. **134**, 2627-2641 (2011).
369. Haidet-Phillips, A.M., *et al.* Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. **29**, 824 (2011).
370. Hensley, K., *et al.* Primary glia expressing the G93A-SOD1 mutation present a neuroinflammatory phenotype and provide a cellular system for studies of glial inflammation. **3**, 2 (2006).
371. Wang, L., Gutmann, D.H. & Roos, R.P.J.H.m.g. Astrocyte loss of mutant SOD1 delays ALS disease onset and progression in G85R transgenic mice. **20**, 286-293 (2010).
372. Philips, T. & Robberecht, W.J.T.L.N. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. **10**, 253-263 (2011).
373. Sussmuth, S.D., Brettschneider, J., Ludolph, A.C. & Tumani, H.J.C.m.c. Biochemical markers in CSF of ALS patients. **15**, 1788-1801 (2008).

374. González, J.D.A.J.F.i.n. Lipid Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis. **10**, 284-284 (2019).
375. Pupillo, E., Messina, P., Logroscino, G., Beghi, E. & neurology, S.G.J.A.o. Long-term survival in amyotrophic lateral sclerosis: A population-based study. **75**, 287-297 (2014).
376. Food, U., Evaluation, D.A.J.C.f.D. & Research . Silver Spring, M.O.o.C., Division of Drug Information. Guidance for industry and FDA staff: qualification process for drug development tools. (2014).
377. Taga, A. & Maragakis, N.J.J.E.r.o.n. Current and emerging ALS biomarkers: utility and potential in clinical trials. **18**, 871-886 (2018).
378. Bowser, R., Connor, J., Turner, M.J.A.L.S. & Dementias, t.F. Cerebrospinal fluid-based biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. 249 (2012).
379. Hu, S., Loo, J.A. & Wong, D.T.J.P. Human body fluid proteome analysis. **6**, 6326-6353 (2006).
380. Verber, N.S., *et al.* Biomarkers in motor neuron disease: a state of the art review. **10**, 291 (2019).
381. Chio, A., *et al.* Prognostic factors in ALS: a critical review. **10**, 310-323 (2009).
382. Chiò, A., Hammond, E.R., Mora, G., Bonito, V. & Filippini, G.J.J.N.N.P. Development and evaluation of a clinical staging system for amyotrophic lateral sclerosis. **86**, 38-44 (2015).
383. Fang, T., *et al.* Comparison of the King's and MiToS staging systems for ALS. **18**, 227-232 (2017).
384. Robelin, L. & Gonzalez De Aguilar, J.L.J.B.r.i. Blood biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis: myth or reality? **2014**(2014).
385. Sakka, L., Coll, G., Chazal, J.J.E.a.o.o., head & diseases, n. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. **128**, 309-316 (2011).
386. Peskind, E.R., *et al.* Safety and acceptability of the research lumbar puncture. **19**, 220-225 (2005).
387. Zetterberg, H., *et al.* Low incidence of post-lumbar puncture headache in 1,089 consecutive memory clinic patients. **63**, 326-330 (2010).
388. Rosengren, L.E., Karlsson, J.E., Karlsson, J.O., Persson, L.I. & Wikkelsø, C.J.J.o.n. Patients with amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases have increased levels of neurofilament protein in CSF. **67**, 2013-2018 (1996).
389. Brettschneider, J., Petzold, A., Süßmuth, S., Ludolph, A. & Tumani, H.J.N. Axonal damage markers in cerebrospinal fluid are increased in ALS. **66**, 852-856 (2006).
390. Van Damme, P. & Poesen, K.J.F.i.n. Diagnostic and prognostic performance of neurofilaments in ALS. **9**, 1167 (2018).

391. Lu, C.-H., *et al.* Neurofilament light chain: a prognostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis. **84**, 2247-2257 (2015).
392. Lee, M.K. & Cleveland, D.W.J.A.r.o.n. Neuronal intermediate filaments. **19**, 187-217 (1996).
393. Yuan, A., Rao, M.V. & Nixon, R.A.J.C.S.H.p.i.b. Neurofilaments and neurofilament proteins in health and disease. **9**, a018309 (2017).
394. Hoyle, J.C., Isfort, M.C., Roggenbuck, J. & Arnold, W.D.J.T.a.o.c.g. The genetics of Charcot–Marie–Tooth disease: current trends and future implications for diagnosis and management. **8**, 235 (2015).
395. Julien, J.-P.J.C. Amyotrophic lateral sclerosis: unfolding the toxicity of the misfolded. **104**, 581-591 (2001).
396. Meeter, L.H., Kaat, L.D., Rohrer, J.D. & Van Swieten, J.C.J.N.R.N. Imaging and fluid biomarkers in frontotemporal dementia. **13**, 406 (2017).
397. Poesen, K., *et al.* Neurofilament markers for ALS correlate with extent of upper and lower motor neuron disease. **88**, 2302-2309 (2017).
398. Steinacker, P., *et al.* Neurofilaments in the diagnosis of motoneuron diseases: a prospective study on 455 patients. **87**, 12-20 (2016).
399. De Schaepdryver, M., *et al.* Comparison of elevated phosphorylated neurofilament heavy chains in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. **89**, 367-373 (2018).
400. Schreiber, S., *et al.* Significance of CSF NfL and tau in ALS. **265**, 2633-2645 (2018).
401. Zetterberg, H., *et al.* Association of cerebrospinal fluid neurofilament light concentration with Alzheimer disease progression. **73**, 60-67 (2016).
402. Bäckström, D.C., *et al.* Cerebrospinal fluid patterns and the risk of future dementia in early, incident Parkinson disease. **72**, 1175-1182 (2015).
403. Kuhle, J., *et al.* Serum neurofilament light chain is a biomarker of human spinal cord injury severity and outcome. **86**, 273-279 (2015).
404. Petzold, A.J.J.o.t.n.s. Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. **233**, 183-198 (2005).
405. Costa, J. & de Carvalho, M.J.C.C.A. Emerging molecular biomarker targets for amyotrophic lateral sclerosis. **455**, 7-14 (2016).
406. Gaiani, A., *et al.* Diagnostic and prognostic biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis: neurofilament light chain levels in definite subtypes of disease. **74**, 525-532 (2017).
407. Steinacker, P., *et al.* Chitotriosidase (CHIT1) is increased in microglia and macrophages in spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis and cerebrospinal fluid levels correlate with disease severity and progression. **89**, 239-247 (2018).

408. Skillbäck, T., Mattsson, N., Blennow, K., Zetterberg, H.J.A.L.S. & Degeneration, F. Cerebrospinal fluid neurofilament light concentration in motor neuron disease and frontotemporal dementia predicts survival. **18**, 397-403 (2017).
409. Boylan, K.B., *et al.* Phosphorylated neurofilament heavy subunit (pNF-H) in peripheral blood and CSF as a potential prognostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis. **84**, 467-472 (2013).
410. Devos, D., *et al.* Low levels of the vascular endothelial growth factor in CSF from early ALS patients. **62**, 2127-2129 (2004).
411. Menke, R.A., *et al.* CSF neurofilament light chain reflects corticospinal tract degeneration in ALS. **2**, 748-755 (2015).
412. Crisp, M.J., *et al.* In vivo kinetic approach reveals slow SOD1 turnover in the CNS. **125**, 2772-2780 (2015).
413. Winer, L., *et al.* SOD1 in cerebral spinal fluid as a pharmacodynamic marker for antisense oligonucleotide therapy. **70**, 201-207 (2013).
414. Wen, X., *et al.* Antisense proline-arginine RAN dipeptides linked to C9ORF72-ALS/FTD form toxic nuclear aggregates that initiate in vitro and in vivo neuronal death. **84**, 1213-1225 (2014).
415. Mackenzie, I.R., *et al.* Dipeptide repeat protein pathology in C9ORF72 mutation cases: clinico-pathological correlations. **126**, 859-879 (2013).
416. Junttila, A., *et al.* Cerebrospinal fluid TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis patients with and without the C9ORF72 hexanucleotide expansion. **6**, 142-149 (2016).
417. Prasad, A., Bharathi, V., Sivalingam, V., Girdhar, A. & Patel, B.K.J.F.i.m.n. Molecular Mechanisms of TDP-43 Misfolding and Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis. **12**(2019).
418. Mackenzie, I.R., *et al.* Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. **61**, 427-434 (2007).
419. Chen-Plotkin, A.S., Lee, V.M.-Y. & Trojanowski, J.Q.J.N.R.N. TAR DNA-binding protein 43 in neurodegenerative disease. **6**, 211 (2010).
420. Steinacker, P., *et al.* TDP-43 in cerebrospinal fluid of patients with frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. **65**, 1481-1487 (2008).
421. Noto, Y.-I., *et al.* Elevated CSF TDP-43 levels in amyotrophic lateral sclerosis: specificity, sensitivity, and a possible prognostic value. **12**, 140-143 (2011).
422. Kasai, T., *et al.* Increased TDP-43 protein in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. **117**, 55-62 (2009).

423. Verstraete, E., *et al.* TDP-43 plasma levels are higher in amyotrophic lateral sclerosis. **13**, 446-451 (2012).
424. Feneberg, E., *et al.* Limited role of free TDP-43 as a diagnostic tool in neurodegenerative diseases. **15**, 351-356 (2014).
425. Abrahamson, M., Barrett, A.J., Salvesen, G. & Grubb, A.J.J.o.b.c. Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. **261**, 11282-11289 (1986).
426. Gauthier, S., Kaur, G., Mi, W., Tizon, B. & Levy, E.J.F.i.b. Protective mechanisms by cystatin C in neurodegenerative diseases. **3**, 541 (2011).
427. Yasuhara, O., *et al.* Expression of cystatin C in rat, monkey and human brains. **628**, 85-92 (1993).
428. Palm, D.E., Knuckey, N.W., Primiano, M.J., Spangenberg, A.G. & Johanson, C.E.J.B.r. Cystatin C, a protease inhibitor, in degenerating rat hippocampal neurons following transient forebrain ischemia. **691**, 1-8 (1995).
429. Miyake, T., *et al.* Up-regulation of cystatin C by microglia in the rat facial nucleus following axotomy. **37**, 273-282 (1996).
430. Sako, W., *et al.* Nuclear factor κ B expression in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis and hereditary amyotrophic lateral sclerosis with optineurin mutations. **31**, 418-423 (2012).
431. Sako, W., Ishimoto, S.J.N. & Neuroscience, C. Can cystatin C in cerebrospinal fluid be a biomarker for amyotrophic lateral sclerosis? A lesson from previous studies. **2**, 72-75 (2014).
432. Pasinetti, G., *et al.* Identification of potential CSF biomarkers in ALS. **66**, 1218-1222 (2006).
433. Tsuji-Akimoto, S., Yabe, I., Niino, M., Kikuchi, S. & Sasaki, H.J.N.I. Cystatin C in cerebrospinal fluid as a biomarker of ALS. **452**, 52-55 (2009).
434. Ryberg, H., *et al.* Discovery and verification of amyotrophic lateral sclerosis biomarkers by proteomics. **42**, 104-111 (2010).
435. Mori, F., Tanji, K., Miki, Y., Wakabayashi, K.J.J.o.N. & Neurology, E. Decreased cystatin C immunoreactivity in spinal motor neurons and astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. **68**, 1200-1206 (2009).
436. Okamoto, K., Mizuno, Y. & Fujita, Y.J.N. Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. **28**, 109-115 (2008).
437. Ranganathan, S., *et al.* Proteomic profiling of cerebrospinal fluid identifies biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. **95**, 1461-1471 (2005).
438. Chen, X., *et al.* Assessment of a multiple biomarker panel for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. **16**, 173 (2016).

439. Wilson, M.E., Boumaza, I., Lacomis, D. & Bowser, R.J.P.o. Cystatin C: a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. **5**, e15133 (2010).
440. Vieira, M. & Saraiva, M.J.J.B.c. Transthyretin: a multifaceted protein. **5**, 45-54 (2014).
441. Vijayakumar, U.G., *et al.* A systematic review of suggested molecular strata, biomarkers and their tissue sources in ALS. **10**, 400 (2019).
442. De Felice, B., *et al.* A miRNA signature in leukocytes from sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **508**, 35-40 (2012).
443. Ricci, C., Marzocchi, C. & Battistini, S.J.C. MicroRNAs as biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. **7**, 219 (2018).
444. Bartel, D.P.J.c. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **136**, 215-233 (2009).
445. Ludwig, N., *et al.* Distribution of miRNA expression across human tissues. **44**, 3865-3877 (2016).
446. Weber, J.A., *et al.* The microRNA spectrum in 12 body fluids. **56**, 1733-1741 (2010).
447. Rao, P., Benito, E. & Fischer, A.J.F.i.m.n. MicroRNAs as biomarkers for CNS disease. **6**, 39 (2013).
448. Rinchetti, P., Rizzuti, M., Faravelli, I. & Corti, S.J.M.n. MicroRNA metabolism and dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. **55**, 2617-2630 (2018).
449. Cogswell, J.P., *et al.* Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. **14**, 27-41 (2008).
450. Alexandrov, P.N., *et al.* microRNA (miRNA) speciation in Alzheimer's disease (AD) cerebrospinal fluid (CSF) and extracellular fluid (ECF). **3**, 365 (2012).
451. Haramati, S., *et al.* miRNA malfunction causes spinal motor neuron disease. **107**, 13111-13116 (2010).
452. Emde, A., *et al.* Dysregulated mi RNA biogenesis downstream of cellular stress and ALS-causing mutations: a new mechanism for ALS. **34**, 2633-2651 (2015).
453. Strong, M.J.J.J.o.t.n.s. The evidence for altered RNA metabolism in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). **288**, 1-12 (2010).
454. Benigni, M., *et al.* Identification of miRNAs as potential biomarkers in cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients. **18**, 551-560 (2016).
455. Freischmidt, A., Müller, K., Ludolph, A.C. & Weishaupt, J.H.J.A.n.c. Systemic dysregulation of TDP-43 binding microRNAs in amyotrophic lateral sclerosis. **1**, 42 (2013).
456. De Felice, B., *et al.* miR-338-3p is over-expressed in blood, CFS, serum and spinal cord from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. **15**, 243-253 (2014).

457. Freischmidt, A., *et al.* Serum microRNAs in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **36**, 2660. e2615-2660. e2620 (2015).
458. Takahashi, I., *et al.* Identification of plasma microRNAs as a biomarker of sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. **8**, 67 (2015).
459. Malaspina, A., Puentes, F. & Amor, S.J.I.i. Disease origin and progression in amyotrophic lateral sclerosis: an immunology perspective. **27**, 117-129 (2014).
460. Xanthos, D.N. & Sandkühler, J.J.N.R.N. Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. **15**, 43 (2014).
461. Blasco, H., *et al.* Panel of oxidative stress and inflammatory biomarkers in ALS: a pilot study. **44**, 90-95 (2017).
462. Lu, C.-H., *et al.* Systemic inflammatory response and neuromuscular involvement in amyotrophic lateral sclerosis. **3**, e244 (2016).
463. Martínez, H.R., *et al.* Altered CSF cytokine network in amyotrophic lateral sclerosis patients: A pathway-based statistical analysis. **90**, 1-5 (2017).
464. Gille, B., *et al.* Inflammatory markers in cerebrospinal fluid: independent prognostic biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis? , jnnp-2018-319586 (2019).
465. Chen, Y., *et al.* Proteomic analysis of cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis. **11**, 2095-2106 (2016).
466. Mitchell, R., *et al.* A CSF biomarker panel for identification of patients with amyotrophic lateral sclerosis. **72**, 14-19 (2009).
467. Guo, J., Yang, X., Gao, L., Zang, D.J.B. & behavior. Evaluating the levels of CSF and serum factors in ALS. **7**, e00637 (2017).
468. Su, X.W., *et al.* Serum ferritin is elevated in amyotrophic lateral sclerosis patients. **16**, 102-107 (2015).
469. McGeer, P., McGeer, E.J.M. & Medicine, N.O.J.o.t.A.A.o.E. Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. **26**, 459-470 (2002).
470. Brites, D. & Vaz, A.R.J.F.i.c.n. Microglia centered pathogenesis in ALS: insights in cell interconnectivity. **8**, 117 (2014).
471. Varghese, A.M., *et al.* Chitotriosidase-a putative biomarker for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **10**, 19 (2013).
472. Martinez-Merino, L., *et al.* Evaluation of Chitotriosidase and CC-Chemokine Ligand 18 as Biomarkers of Microglia Activation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. **18**, 208-215 (2018).
473. Thompson, A.G., *et al.* Cerebrospinal fluid macrophage biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. **83**, 258-268 (2018).

474. Pagliardini, V., *et al.* Chitotriosidase and lysosomal enzymes as potential biomarkers of disease progression in amyotrophic lateral sclerosis: a survey clinic-based study. **348**, 245-250 (2015).
475. Collins, M.A., An, J., Hood, B.L., Conrads, T.P. & Bowser, R.P.J.J.o.p.r. Label-free LC-MS/MS proteomic analysis of cerebrospinal fluid identifies protein/pathway alterations and candidate biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. **14**, 4486-4501 (2015).
476. Kuhle, J., *et al.* Increased levels of inflammatory chemokines in amyotrophic lateral sclerosis. **16**, 771-774 (2009).
477. Su, X.W., *et al.* Biomarker-based predictive models for prognosis in amyotrophic lateral sclerosis. **70**, 1505-1511 (2013).
478. Moreau, C., *et al.* CSF profiles of angiogenic and inflammatory factors depend on the respiratory status of ALS patients. **10**, 175-181 (2009).
479. Almer, G., *et al.* Increased levels of the pro-inflammatory prostaglandin PGE2 in CSF from ALS patients. **58**, 1277-1279 (2002).
480. Ilzecka, J.J.A.n.s. Prostaglandin E2 is increased in amyotrophic lateral sclerosis patients. **108**, 125-129 (2003).
481. Moreau, C., *et al.* Elevated IL-6 and TNF- α levels in patients with ALS: inflammation or hypoxia? **65**, 1958-1960 (2005).
482. Lind, A.-L., *et al.* A multiplex protein panel applied to cerebrospinal fluid reveals three new biomarker candidates in ALS but none in neuropathic pain patients. **11**, e0149821 (2016).
483. Tefera, T.W. & Borges, K.J.F.i.n. Metabolic dysfunctions in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis and potential metabolic treatments. **10**, 611 (2017).
484. Turner, M.R., *et al.* Mechanisms, models and biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. **14**, 19-32 (2013).
485. Blasco, H., Mavel, S., Corcia, P. & Gordon, P.J.C.m.c. The glutamate hypothesis in ALS: pathophysiology and drug development. **21**, 3551-3575 (2014).
486. Rothstein, J.D., *et al.* Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. **28**, 18-25 (1990).
487. Spreux-Varoquaux, O., *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. **193**, 73-78 (2002).
488. Cid, C., Alvarez-Cermeño, J.C., Regidor, I., Salinas, M. & Alcazar, A.J.J.o.t.n.s. Low concentrations of glutamate induce apoptosis in cultured neurons: implications for amyotrophic lateral sclerosis. **206**, 91-95 (2003).

489. Yáñez, M., *et al.* CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients produces glutamate independent death of rat motor brain cortical neurons: protection by resveratrol but not riluzole. **1423**, 77-86 (2011).
490. Shaw, P.J., Forrest, V., Ince, P.G., Richardson, J.P. & Wastell, H.J.J.N. CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. **4**, 209-216 (1995).
491. Perry, T.L., Krieger, C., Hansen, S. & Eisen, A.J.A.o.n. Amyotrophic lateral sclerosis: amino acid levels in plasma and cerebrospinal fluid. **28**, 12-17 (1990).
492. Blin, O., Samuel, D., Nieoullon, A., Serratice, G.J.J.o.n., neurosurgery, & psychiatry. Changes in CSF amino acid concentrations during the evolution of amyotrophic lateral sclerosis. **57**, 119 (1994).
493. Bogdanov, M., *et al.* Increased oxidative damage to DNA in ALS patients. **29**, 652-658 (2000).
494. Beal, M.F., *et al.* Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. **42**, 644-654 (1997).
495. Simpson, E., Henry, Y., Henkel, J., Smith, R. & Appel, S.H.J.N. Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. **62**, 1758-1765 (2004).
496. Ehrhart, J., *et al.* Humoral factors in ALS patients during disease progression. **12**, 127 (2015).
497. Opačić, M., *et al.* Can Oxidation–Reduction Potential of Cerebrospinal Fluid Be a Monitoring Biomarker in Amyotrophic Lateral Sclerosis? (Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, 2018).
498. Abdel-Khalik, J., *et al.* Defective cholesterol metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. **58**, 267-278 (2017).
499. Wuolikainen, A., *et al.* Cholesterol, oxysterol, triglyceride, and coenzyme Q homeostasis in ALS. Evidence against the hypothesis that elevated 27-hydroxycholesterol is a pathogenic factor. **9**, e113619 (2014).
500. Bozik, M.E., *et al.* A post hoc analysis of subgroup outcomes and creatinine in the phase III clinical trial (EMPOWER) of dexamipexole in ALS. **15**, 406-413 (2014).
501. Zoccolella, S., *et al.* An exploratory study of serum urate levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **258**, 238-243 (2011).
502. Keizman, D., *et al.* Low uric acid levels in serum of patients with ALS: further evidence for oxidative stress? **285**, 95-99 (2009).
503. Auinger, P., Kieburz, K. & Mcdermott, M.P.J.M.D. The relationship between uric acid levels and Huntington's disease progression. **25**, 224-228 (2010).

504. Ikeda, K., Hirayama, T., Takazawa, T., Kawabe, K. & Iwasaki, Y.J.I.m. Relationships between disease progression and serum levels of lipid, urate, creatinine and ferritin in Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis: a cross-sectional study. **51**, 1501-1508 (2012).
505. Zach, N., *et al.* Being PRO-ACTive: what can a clinical trial database reveal about ALS? **12**, 417-423 (2015).
506. Atassi, N., *et al.* The PRO-ACT database: design, initial analyses, and predictive features. **83**, 1719-1725 (2014).
507. Blasco, H., *et al.* Metabolomics in amyotrophic lateral sclerosis: how far can it take us? **23**, 447-454 (2016).
508. Blasco, H., *et al.* Lipidomics reveals cerebrospinal-fluid signatures of ALS. **7**, 17652 (2017).
509. Spector, R., Keep, R.F., Snodgrass, S.R., Smith, Q.R. & Johanson, C.E.J.E.n. A balanced view of choroid plexus structure and function: focus on adult humans. **267**, 78-86 (2015).
510. Johanson, C.E., Stopa, E.G. & McMillan, P.N. The blood–cerebrospinal fluid barrier: structure and functional significance. in *The blood-brain and other neural barriers* 101-131 (Springer, 2011).
511. Weydt, P., *et al.* Neurofilament levels as biomarkers in asymptomatic and symptomatic familial amyotrophic lateral sclerosis. **79**, 152-158 (2016).
512. Lehmer, C., *et al.* Poly-GP in cerebrospinal fluid links C9orf72-associated dipeptide repeat expression to the asymptomatic phase of ALS/FTD. **9**, 859-868 (2017).
513. Gendron, T.F., *et al.* Poly (GP) proteins are a useful pharmacodynamic marker for C9ORF72-associated amyotrophic lateral sclerosis. **9**, eaai7866 (2017).
514. De Marco, G., *et al.* Cytoplasmic accumulation of TDP-43 in circulating lymphomonocytes of ALS patients with and without TARDBP mutations. **121**, 611-622 (2011).
515. Nardo, G., *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis multiprotein biomarkers in peripheral blood mononuclear cells. **6**, e25545 (2011).
516. Suárez-Calvet, M., *et al.* Plasma phosphorylated TDP-43 levels are elevated in patients with frontotemporal dementia carrying a C9orf72 repeat expansion or a GRN mutation. **85**, 684-691 (2014).
517. Ganesalingam, J., *et al.* Combination of neurofilament heavy chain and complement C3 as CSF biomarkers for ALS. **117**, 528-537 (2011).
518. Gendron, T.F., *et al.* Antisense transcripts of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat form nuclear RNA foci and undergo repeat-associated non-ATG translation in c9FTD/ALS. **126**, 829-844 (2013).

519. McCombe, P., *et al.* Serial measurements of phosphorylated neurofilament-heavy in the serum of subjects with amyotrophic lateral sclerosis. **353**, 122-129 (2015).
520. Feneberg, E., *et al.* Multicenter evaluation of neurofilaments in early symptom onset amyotrophic lateral sclerosis. **90**, e22-e30 (2018).
521. Li, D.-W., *et al.* Diagnostic performance of neurofilaments in chinese patients with amyotrophic lateral sclerosis: a prospective study. **9**(2018).
522. Toivonen, J.M., *et al.* MicroRNA-206: a potential circulating biomarker candidate for amyotrophic lateral sclerosis. **9**, e89065 (2014).
523. Waller, R., *et al.* Serum miRNAs miR-206, 143-3p and 374b-5p as potential biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis (ALS). **55**, 123-131 (2017).
524. Raheja, R., *et al.* Correlating serum micrnas and clinical parameters in amyotrophic lateral sclerosis. **58**, 261-269 (2018).
525. de Andrade, H.M., *et al.* MicroRNAs-424 and 206 are potential prognostic markers in spinal onset amyotrophic lateral sclerosis. **368**, 19-24 (2016).
526. Freischmidt, A., *et al.* Serum microRNAs in patients with genetic amyotrophic lateral sclerosis and pre-manifest mutation carriers. **137**, 2938-2950 (2014).
527. Pronto-Laborinho, A., *et al.* Interleukin-6 and amyotrophic lateral sclerosis. **398**, 50-53 (2019).
528. Ono, S., Hu, J., Shimizu, N., Imai, T. & Nakagawa, H.J.J.o.t.n.s. Increased interleukin-6 of skin and serum in amyotrophic lateral sclerosis. **187**, 27-34 (2001).
529. Pronto-Laborinho, A., *et al.* Plasma level of club-cell (CC-16) predicts outcome in amyotrophic lateral sclerosis. **137**, 233-237 (2018).
530. Hu, Y., *et al.* Increased peripheral blood inflammatory cytokine levels in amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis study. **7**, 9094 (2017).
531. Garbuzova-Davis, S., Ehrhart, J., Sanberg, P. & Borlongan, C.J.I.j.o.m.s. Potential role of humoral IL-6 cytokine in mediating pro-inflammatory endothelial cell response in amyotrophic lateral sclerosis. **19**, 423 (2018).
532. Evans, M., Couch, Y., Sibson, N., Turner, M.J.M. & Neuroscience, C. Inflammation and neurovascular changes in amyotrophic lateral sclerosis. **53**, 34-41 (2013).
533. Houi, K., Kobayashi, T., Kato, S., Mochio, S. & Inoue, K.J.A.n.s. Increased plasma TGF- β 1 in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **106**, 299-301 (2002).
534. Iizecka, J., Stelmasiak, Z. & Dobosz, B.J.C. Transforming growth factor-Beta 1 (tgf-Beta 1) in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **20**, 239-243 (2002).
535. Katsuno, M., *et al.* Transforming growth factor- β signaling in motor neuron diseases. **11**, 48-56 (2011).
536. Peters, S., *et al.* The TgF- β system as a Potential Pathogenic Player in Disease Modulation of amyotrophic lateral sclerosis. **8**, 669 (2017).

537. Gustafson, M.P., *et al.* Comprehensive immune profiling reveals substantial immune system alterations in a subset of patients with amyotrophic lateral sclerosis. **12**, e0182002 (2017).
538. Zondler, L., *et al.* Peripheral monocytes are functionally altered and invade the CNS in ALS patients. **132**, 391-411 (2016).
539. Hou, L., *et al.* Screening of SOD1, FUS and TARDBP genes in patients with amyotrophic lateral sclerosis in central-southern China. **6**, 32478 (2016).
540. Nagel, G., *et al.* Adipokines, C-reactive protein and Amyotrophic Lateral Sclerosis—results from a population-based ALS registry in Germany. **7**, 4374 (2017).
541. Patin, F., *et al.* Biological follow-up in amyotrophic lateral sclerosis: decrease in creatinine levels and increase in ferritin levels predict poor prognosis. **22**, 1385-1390 (2015).
542. Chiò, A., *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis outcome measures and the role of albumin and creatinine: a population-based study. **71**, 1134-1142 (2014).
543. Rafiq, M., Lee, E., Bradburn, M., McDermott, C. & Shaw, P.J.E.j.o.n. Creatine kinase enzyme level correlates positively with serum creatinine and lean body mass, and is a prognostic factor for survival in amyotrophic lateral sclerosis. **23**, 1071-1078 (2016).
544. Lanznaster, D., *et al.* Plasma creatinine and amyotrophic lateral sclerosis prognosis: a systematic review and meta-analysis. 1-8 (2019).
545. Tai, H., *et al.* Correlation of creatine kinase levels with clinical features and survival in amyotrophic lateral sclerosis. **8**, 322 (2017).
546. Ong, M.-L., Tan, P.F. & Holbrook, J.D.J.P.o. Predicting functional decline and survival in amyotrophic lateral sclerosis. **12**, e0174925 (2017).
547. Cecchi, M., *et al.* Plasma amino acids patterns and age of onset of amyotrophic lateral sclerosis. **15**, 371-375 (2014).
548. Andreadou, E., *et al.* Plasma glutamate and glycine levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **22**, 137-141 (2008).
549. Andreadou, E., *et al.* Plasma glutamate and glycine levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis: the effect of riluzole treatment. **110**, 222-226 (2008).
550. Niebroj-Dobosz, I., Janik, P. & Kwieciński, H.J.A.n.s. Effect of Riluzole on serum amino acids in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **106**, 39-43 (2002).
551. Lawton, K.A., *et al.* Plasma metabolomic biomarker panel to distinguish patients with amyotrophic lateral sclerosis from disease mimics. **15**, 362-370 (2014).
552. Palma, A.S., *et al.* Proteomic analysis of plasma from Portuguese patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. **9**, 339-349 (2008).
553. Lawton, K.A., *et al.* Biochemical alterations associated with ALS. **13**, 110-118 (2012).

554. Conraux, L., *et al.* Plasma Peptide Biomarker Discovery for Amyotrophic Lateral Sclerosis by MALDI–TOF Mass Spectrometry Profiling. **8**, e79733 (2013).
555. Wuolikainen, A., *et al.* Multi-platform mass spectrometry analysis of the CSF and plasma metabolomes of rigorously matched amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease and control subjects. **12**, 1287-1298 (2016).
556. Xu, Z., *et al.* Mass spectrometry analysis of plasma from amyotrophic lateral sclerosis and control subjects. **19**, 362-376 (2018).
557. Mariosa, D., *et al.* Blood biomarkers of carbohydrate, lipid, and apolipoprotein metabolisms and risk of amyotrophic lateral sclerosis: A more than 20-year follow-up of the Swedish AMORIS cohort. **81**, 718-728 (2017).
558. Bakkar, N., Boehringer, A. & Bowser, R.J.B.r. Use of biomarkers in ALS drug development and clinical trials. **1607**, 94-107 (2015).
559. Nadjar, Y., *et al.* Elevated serum ferritin is associated with reduced survival in amyotrophic lateral sclerosis. **7**, e45034 (2012).
560. Oh, S.-i., *et al.* Prognostic role of serum levels of uric acid in amyotrophic lateral sclerosis. **11**, 376-382 (2015).
561. Zheng, Z., *et al.* Serum uric acid level is associated with the prevalence but not with survival of amyotrophic lateral sclerosis in a Chinese population. **29**, 771-775 (2014).
562. O'Reilly, É.J., *et al.* Pre-diagnostic plasma urate and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. **19**, 194-200 (2018).
563. Paganoni, S., *et al.* Urate levels predict survival in amyotrophic lateral sclerosis: analysis of the expanded Pooled Resource Open-Access ALS clinical trials database. **57**, 430-434 (2018).
564. Bocca, B., *et al.* Level of neurotoxic metals in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based case–control study. **359**, 11-17 (2015).
565. Forte, G., *et al.* Essential trace elements in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): results in a population of a risk area of Italy. **38**, 1609-1615 (2017).
566. Oggiano, R., *et al.* Trace elements in ALS patients and their relationships with clinical severity. **197**, 457-466 (2018).
567. Sheppard, S.R., Chataway, T., Schultz, D.W., Rush, R.A. & Rogers, M.-L.J.P.O. The extracellular domain of neurotrophin receptor p75 as a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. **9**, e87398 (2014).
568. Ono, S., Shimizu, N., Imai, T., Rodriguez, G.P.J.M. & Medicine, N.O.J.o.t.A.A.o.E. Urinary collagen metabolite excretion in amyotrophic lateral sclerosis. **24**, 821-825 (2001).
569. Ono, S., *et al.* Decreased urinary concentrations of type IV collagen in amyotrophic lateral sclerosis. **100**, 111-116 (1999).

570. Pratico, D., Lawson, J.A. & Fitzgerald, G.A.J.A.o.t.N.Y.A.o.S. Cyclooxygenase-Dependent Formation of the Isoprostane 8-EPI Prostaglandin F₂α a. **744**, 139-145 (1994).
571. Ono, S., *et al.* Collagen abnormalities in the spinal cord from patients with amyotrophic lateral sclerosis. **160**, 140-147 (1998).
572. Sheppard, S.R., *et al.* Urinary p75ECD: A prognostic, disease progression, and pharmacodynamic biomarker in ALS. **88**, 1137-1143 (2017).
573. Jia, R., *et al.* Urinary extracellular domain of neurotrophin receptor p75 as a biomarker for amyotrophic lateral sclerosis in a Chinese cohort. **7**, 5127 (2017).
574. Obayashi, K., *et al.* Salivary chromogranin A: useful and quantitative biochemical marker of affective state in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **47**, 1875-1879 (2008).
575. Roozendaal, B., *et al.* The cortisol awakening response in amyotrophic lateral sclerosis is blunted and correlates with clinical status and depressive mood. **37**, 20-26 (2012).
576. Ganesalingam, J., *et al.* pNfH is a promising biomarker for ALS. **14**, 146-149 (2013).
577. Clos, A.L., Kaye, R. & Lasagna Reeves, C.J.F.i.n. Association of skin with the pathogenesis and treatment of neurodegenerative amyloidosis. **3**, 5 (2012).
578. Pare, B. & Gros-Louis, F.J.R.i.t.N. Potential skin involvement in ALS: revisiting Charcot's observation—a review of skin abnormalities in ALS. **28**, 551-572 (2017).
579. Oketa, Y., Higashida, K., Fukasawa, H., Tsukie, T. & Ono, S.J.A.N.S. Abundant FUS-immunoreactive pathology in the skin of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **128**, 257-264 (2013).
580. Paré, B., *et al.* Early detection of structural abnormalities and cytoplasmic accumulation of TDP-43 in tissue-engineered skins derived from ALS patients. **3**, 5 (2015).
581. O'Reilly, É.J., *et al.* Premorbid body mass index and risk of amyotrophic lateral sclerosis. **14**, 205-211 (2013).
582. Kirk, S.E., Tracey, T.J., Steyn, F.J. & Ngo, S.T.J.F.i.n. Biomarkers of metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. **10**(2019).
583. Marin, B., *et al.* Alteration of nutritional status at diagnosis is a prognostic factor for survival of amyotrophic lateral sclerosis patients. **82**, 628-634 (2011).
584. Claude Desport, P.M.P., Cao Tri Truong, Laurent Courat, Jean Michel Vallat, Philippe Couratier, Jean %J Amyotrophic Lateral Sclerosis & Disorders, O.M.N. Nutritional assessment and survival in ALS patients. **1**, 91-96 (2000).

585. Genton, L., Viatte, V., Janssens, J.-P., Héritier, A.-C. & Pichard, C.J.C.N. Nutritional state, energy intakes and energy expenditure of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients. **30**, 553-559 (2011).
586. Mousavi, S.-A.J., *et al.* Pulmonary function tests in patients with amyotrophic lateral sclerosis and the association between these tests and survival. **13**, 131 (2014).
587. Hardiman, O.J.J.o.n. Management of respiratory symptoms in ALS. **258**, 359-365 (2011).
588. Corcia, P., *et al.* Causes of death in a post-mortem series of ALS patients. **9**, 59-62 (2008).
589. De Carvalho, M., Swash, M. & Pinto, S.J.F.i.n. Diaphragmatic Neurophysiology and Respiratory Markers in ALS. **10**(2019).
590. Lyall, R., *et al.* A prospective study of quality of life in ALS patients treated with noninvasive ventilation. **57**, 153-156 (2001).
591. Newsom-Davis, I., *et al.* The effect of non-invasive positive pressure ventilation (NIPPV) on cognitive function in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a prospective study. **71**, 482-487 (2001).
592. Irwin, D., Lipka, C.F., Swearer, J.J.A.J.o.A.s.D. & Dementias®, O. Cognition and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). **22**, 300-312 (2007).
593. Benditt, J.O. Respiratory complications of amyotrophic lateral sclerosis. in *Seminars in respiratory and critical care medicine*, Vol. 23 239-247 (Copyright© 2002 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New ..., 2002).
594. Atalaia, A., Carvalho, M.D., Evangelista, T. & Pinto, A.J.A.L.S. Sleep characteristics of amyotrophic lateral sclerosis in patients with preserved diaphragmatic function. **8**, 101-105 (2007).
595. Polkey, M.I., *et al.* Respiratory muscle strength as a predictive biomarker for survival in amyotrophic lateral sclerosis. **195**, 86-95 (2017).
596. Phukan, J., Pender, N.P. & Hardiman, O.J.T.L.N. Cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis. **6**, 994-1003 (2007).
597. Elman, L., Siderowf, A., Houseman, G., Kelley, M. & McCluskey, L.J.A.L.S. Venous thrombosis in an ALS population over four years. **6**, 246-249 (2005).
598. Farrero, E., *et al.* Survival in amyotrophic lateral sclerosis with home mechanical ventilation: the impact of systematic respiratory assessment and bulbar involvement. **127**, 2132-2138 (2005).
599. Hutchinson, J.J.M.-c.t. On the capacity of the lungs, and on the respiratory functions, with a view of establishing a precise and easy method of detecting disease by the spirometer. **29**, 137 (1846).

600. Czaplinski, A., Yen, A., Appel, S.H.J.J.o.N., *Neurology & Psychiatry*. Forced vital capacity (FVC) as an indicator of survival and disease progression in an ALS clinic population. **77**, 390-392 (2006).
601. Stambler, N., Charatan, M. & Cedarbaum, J.M.J.N. Prognostic indicators of survival in ALS. **50**, 66-72 (1998).
602. Fallat, R.J., Jewitt, B., Bass, M., Kamm, B. & Norris, F.H.J.A.o.n. Spirometry in amyotrophic lateral sclerosis. **36**, 74-80 (1979).
603. Morgan, R.K., *et al.* Use of Sniff nasal-inspiratory force to predict survival in amyotrophic lateral sclerosis. **171**, 269-274 (2005).
604. De Troyer, A., Borenstein, S. & Cordier, R.J.T. Analysis of lung volume restriction in patients with respiratory muscle weakness. **35**, 603-610 (1980).
605. Baumann, F., *et al.* Use of respiratory function tests to predict survival in amyotrophic lateral sclerosis. **11**, 194-202 (2010).
606. Miller, R., *et al.* Practice parameter update: the care of the patient with amyotrophic lateral sclerosis: multidisciplinary care, symptom management, and cognitive/behavioral impairment (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. **73**, 1227-1233 (2009).
607. Jackson, C.E., *et al.* A preliminary evaluation of a prospective study of pulmonary function studies and symptoms of hypoventilation in ALS/MND patients. **191**, 75-78 (2001).
608. Hardiman, O., Van Den Berg, L.H. & Kiernan, M.C.J.N.r.n. Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. **7**, 639 (2011).
609. Coco, D.L., *et al.* Sleep-wake disturbances in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **82**, 839-842 (2011).
610. Vitacca, M., *et al.* Breathing pattern and respiratory mechanics in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **10**, 1614-1621 (1997).
611. Janssens, J.-P., Borel, J.-C., Pépin, J.-L. & Thorax, S.G.J. Nocturnal monitoring of home non-invasive ventilation: the contribution of simple tools such as pulse oximetry, capnography, built-in ventilator software and autonomic markers of sleep fragmentation. **66**, 438-445 (2011).
612. Lechtzin, N., *et al.* Respiratory measures in amyotrophic lateral sclerosis. **19**, 321-330 (2018).
613. Lanka, V. & Cudkowicz, M.J.A.L.S. Therapy development for ALS: lessons learned and path forward. **9**, 131-140 (2008).
614. Capozzo, R., *et al.* Sniff nasal inspiratory pressure as a prognostic factor of tracheostomy or death in amyotrophic lateral sclerosis. **262**, 593-603 (2015).

615. Pinto, S., Pinto, A., Atalaia, A., Peralta, R. & De Carvalho, M.J.A.L.S. Respiratory apraxia in amyotrophic lateral sclerosis. **8**, 180-184 (2007).
616. Pinto, S., Geraldes, R., Vaz, N., Pinto, A. & de Carvalho, M.J.C.n. Changes of the phrenic nerve motor response in amyotrophic lateral sclerosis: longitudinal study. **120**, 2082-2085 (2009).
617. Pinto, S., Turkman, A., Pinto, A., Swash, M. & de Carvalho, M.J.C.n. Predicting respiratory insufficiency in amyotrophic lateral sclerosis: the role of phrenic nerve studies. **120**, 941-946 (2009).
618. Jenkins, J.L., *et al.* Phrenic nerve conduction studies as a biomarker of respiratory insufficiency in amyotrophic lateral sclerosis. **17**, 213-220 (2016).
619. Fantini, R., *et al.* Ultrasound assessment of diaphragmatic function in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **21**, 932-938 (2016).
620. Widdicombe, J. & Pack, R.J.E.j.o.r.d. The Clara cell. **63**, 202-220 (1982).
621. Shijubo, N., Kawabata, I., Sato, N. & Itoh, Y.J.C.p.d. Clinical aspects of Clara cell 10-kDa protein/uteroglobin (secretoglobin 1A1). **9**, 1139-1149 (2003).
622. Hantson, P., Bernard, A. & Hermans, C.J.C.T. Kinetics and determinants of the changes of CC16, a lung secretory protein in a rat model of toxic lung injury. **46**, 230-238 (2008).
623. Singh, G., Katyal, S.L.J.A.j.o.r.c. & biology, m. Clara cells and Clara cell 10 kD protein (CC10). **17**, 141-143 (1997).
624. Mandal, A.K., *et al.* Uteroglobin Represses Allergen-induced Inflammatory Response by Blocking PGD2 Receptor-mediated Functions. **199**, 1317-1330 (2004).
625. Mukherjee, A., *et al.* Uteroglobin: a novel cytokine? **55**, 771-787 (1999).
626. Briana, D.D., *et al.* Clara cell protein in full-term pregnancies: The influence of intrauterine growth restriction. **45**, 1186-1191 (2010).
627. Sarafidis, K., *et al.* Clara cell secretory protein (CC16) as a peripheral blood biomarker of lung injury in ventilated preterm neonates. **167**, 1297 (2008).
628. Yoon, J.M., *et al.* The immune modulation of Clara cell-10 in human peripheral monocytes and dendritic cells. **26**, 415-423 (2010).
629. Levin, S.W., Butler, J.D., Schumacher, U.K., Wightman, P.D. & Mukherjee, A.B.J.L.s. Uteroglobin inhibits phospholipase A2 activity. **38**, 1813-1819 (1986).
630. Miele, L., Cordella-Miele, E. & Mukherjee, A.B.J.E.r. Uteroglobin: structure, molecular biology, and new perspectives on its function as a phospholipase A2 inhibitor. **8**, 474-490 (1987).
631. Wutzler, S., *et al.* Clara cell protein 16: A biomarker for detecting secondary respiratory complications in patients with multiple injuries. **73**, 838-842 (2012).

632. Ishikawa, N., *et al.* Airway inflammation in Japanese COPD patients compared with smoking and nonsmoking controls. **10**, 185 (2015).
633. Brandt, C. & Pedersen, B.K.J.B.R.I. The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. **2010**(2010).
634. Banks, W.A., Kastin, A.J. & Gutierrez, E.G.J.N.I. Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. **179**, 53-56 (1994).
635. Petersen, A.M.W. & Pedersen, B.K.J.J.o.a.p. The anti-inflammatory effect of exercise. **98**, 1154-1162 (2005).
636. Steensberg, A., *et al.* IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. **285**, E433-E437 (2003).
637. Fattori, E., *et al.* Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. **180**, 1243-1250 (1994).
638. Dann, S.M., *et al.* IL-6-dependent mucosal protection prevents establishment of a microbial niche for attaching/effacing lesion-forming enteric bacterial pathogens. **180**, 6816-6826 (2008).
639. Xing, Z., *et al.* IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. **101**, 311-320 (1998).
640. Tilg, H., Dinarello, C.A. & Mier, J.W.J.I.t. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. **18**, 428-432 (1997).
641. Sekizawa, T., *et al.* Cerebrospinal fluid interleukin 6 in amyotrophic lateral sclerosis: immunological parameter and comparison with inflammatory and non-inflammatory central nervous system diseases. **154**, 194-199 (1998).
642. Ngo, S.T., *et al.* Exploring targets and therapies for amyotrophic lateral sclerosis: current insights into dietary interventions. **7**, 95 (2017).
643. Tanaka, M., *et al.* Intrathecal upregulation of granulocyte colony stimulating factor and its neuroprotective actions on motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. **65**, 816-825 (2006).
644. Alberti, A., *et al.* Plasma cytokine levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome: a preliminary study. **12**, 305-311 (2003).
645. Michiels, C., Arnould, T. & Remacle, J.J.B.e.B.A.-M.C.R. Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions. **1497**, 1-10 (2000).
646. Baxmann, A.C., *et al.* Influence of muscle mass and physical activity on serum and urinary creatinine and serum cystatin C. **3**, 348-354 (2008).
647. Schutte, J.E., Longhurst, J.C., Gaffney, F.A., Bastian, B.C. & Blomqvist, C.G.J.J.o.A.P. Total plasma creatinine: an accurate measure of total striated muscle mass. **51**, 762-766 (1981).
648. Burtis, C.A. & Ashwood, E.R. Tietz textbook of clinical chemistry. (1999).

649. Burtis, C.A. & Bruns, D.E. *Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics-e-book*, (Elsevier Health Sciences, 2014).
650. Chen, X., *et al.* An exploratory study of serum creatinine levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **35**, 1591-1597 (2014).
651. Kumar, A., Ghosh, D. & Singh, R.J.J.o.b. Amyotrophic lateral sclerosis and metabolomics: clinical implication and therapeutic approach. **2013**(2013).
652. Küffner, R., *et al.* Crowdsourced analysis of clinical trial data to predict amyotrophic lateral sclerosis progression. **33**, 51 (2015).
653. Lunetta, C., *et al.* Amyotrophic Lateral Sclerosis Survival Score (ALS-SS): a simple scoring system for early prediction of patient survival. **17**, 93-100 (2016).
654. Paillisse, C., *et al.* Prognostic factors for survival in amyotrophic lateral sclerosis patients treated with riluzole. **6**, 37-44 (2005).
655. Averett, L.E. & Schoenfisch, M.H.J.A. Atomic force microscope studies of fibrinogen adsorption. **135**, 1201-1209 (2010).
656. De Oliveira, S., de Almeida, V.V., Calado, A., Rosário, H. & Saldanha, C.J.B.e.B.A.-B. Integrin-associated protein (CD47) is a putative mediator for soluble fibrinogen interaction with human red blood cells membrane. **1818**, 481-490 (2012).
657. Papageorgiou, N., Tousoulis, D., Siasos, G. & Stefanadis, C.J.H.J.C. Is fibrinogen a marker of inflammation in coronary artery disease. **51**, 1-9 (2010).
658. Lopes, C.I.d.S. Master Thesis, (2016).
659. Guedes, A.F.B.D. Molecular characterization of the fibrinogen-erythrocyte interaction as a cardiovascular risk. (2018).
660. Farrell, D.H.J.C.c. & medicine, I. γ' Fibrinogen as a novel marker of thrombotic disease. **50**, 1903-1909 (2012).
661. Alexander, K.S., Madden, T.E., Farrell, D.H.J.T. & haemostasis. Association between γ' fibrinogen levels and inflammation. **105**, 605-609 (2011).
662. Lovely, R.S., *et al.* Assessment of genetic determinants of the association of γ' fibrinogen in relation to cardiovascular disease. **31**, 2345-2352 (2011).
663. Cheung, E.Y., *et al.* Fibrinogen γ' in ischemic stroke: a case-control study. **39**, 1033-1035 (2008).
664. Mosesson, M.W.J.T. & haemostasis. Update on antithrombin I (fibrin). **98**, 105-108 (2007).
665. Appiah, D., Heckbert, S.R., Cushman, M., Psaty, B.M. & Folsom, A.R.J.T.r. Lack of association of plasma gamma prime (γ') fibrinogen with incident cardiovascular disease. **143**, 50-52 (2016).
666. Libby, P., Ridker, P.M. & Hansson, G.K.J.J.o.t.A.c.o.c. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. **54**, 2129-2138 (2009).

667. Cheung, E.Y., *et al.* Fibrinogen in Ischemic Stroke. (2008).
668. Van den Herik, E., *et al.* Fibrinogen γ' levels in patients with intracerebral hemorrhage. **129**, 807-809 (2012).
669. Mosesson, M.J.J.o.T. & Haemostasis. Fibrinogen γ chain functions. **1**, 231-238 (2003).
670. de Willige, S.U., Standeven, K.F., Philippou, H. & Ariëns, R.A.J.B. The pleiotropic role of the fibrinogen γ' chain in hemostasis. **114**, 3994-4001 (2009).
671. Baskurt, O.K. & Meiselman, H.J. Blood rheology and hemodynamics. in *Seminars in thrombosis and hemostasis*, Vol. 29 435-450 (Copyright© 2003 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New ..., 2003).
672. Buys, A.V., *et al.* Changes in red blood cell membrane structure in type 2 diabetes: a scanning electron and atomic force microscopy study. **12**, 25 (2013).
673. Danon, D. & Marikovsky, Y.J.B.C. The aging of the red blood cell. A multifactor process. **14**, 7-18 (1988).
674. Girasole, M., Dinarelli, S. & Boumis, G.J.M. Structure and function in native and pathological erythrocytes: a quantitative view from the nanoscale. **43**, 1273-1286 (2012).
675. Kozlova, E.K., Chernysh, A.M., Moroz, V.V. & Kuzovlev, A.N.J.M. Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. **44**, 218-227 (2013).
676. Steck, T.L. & Yu, J.J.J.o.s.s. Selective solubilization of proteins from red blood cell membranes by protein perturbants. **1**, 220-232 (1973).
677. Yu, J., Fischman, D.A. & Steck, T.L.J.J.o.s.s. Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. **1**, 233-248 (1973).
678. Betz, T., Bakowsky, U., Müller, M.R., Lehr, C.-M. & Bernhardt, I.J.B. Conformational change of membrane proteins leads to shape changes of red blood cells. **70**, 122-126 (2007).
679. Antonio, P.D., Lasalvia, M., Perna, G. & Capozzi, V.J.B.e.B.A.-B. Scale-independent roughness value of cell membranes studied by means of AFM technique. **1818**, 3141-3148 (2012).
680. Moroz, V.V., *et al.* Comparison of red blood cell membrane microstructure after different physicochemical influences: atomic force microscope research. **25**, 539. e531-539. e512 (2010).
681. Girasole, M., *et al.* Roughness of the plasma membrane as an independent morphological parameter to study RBCs: a quantitative atomic force microscopy investigation. **1768**, 1268-1276 (2007).

682. Diez-Silva, M., Dao, M., Han, J., Lim, C.-T. & Suresh, S.J.M.b. Shape and biomechanical characteristics of human red blood cells in health and disease. **35**, 382-388 (2010).
683. Kim, J., Lee, H. & Shin, S.J.J.o.C.B. Advances in the measurement of red blood cell deformability: A brief review. **1**, 63-79 (2015).
684. Resch, K., *et al.* Can rheologic variables be of prognostic relevance in arteriosclerotic diseases? **42**, 963-970 (1991).
685. Schmid-Schönbein, H.J.L.R.i.c.e.i.l. Blood rheology and physiology of microcirculation. **11**, 13-33 (1981).
686. Stoltz, J.J.L.R.i.c.e.i.l. Red blood cell microrheology (clinical and pharmacological applications). **13**, 53-70 (1983).
687. Pretorius, E.J.C.d. The adaptability of red blood cells. **12**, 63 (2013).
688. Dormandy, J.J.W.m.W. The clinical relevance of the flow properties of blood cells. **136**, 41-43 (1986).
689. Gori, T., *et al.* The effect of ischemia and reperfusion on microvascular function: a human in vivo comparative study with conduit arteries. **35**, 169-173 (2006).
690. Stoltz, J., *et al.* Introduction to endothelial cell biology. **37**, 5-8 (2007).
691. Da Costa, L., Galimand, J., Fenneteau, O. & Mohandas, N.J.B.r. Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders. **27**, 167-178 (2013).
692. Binning, G. & Quate, C.J.R.L. Gerber Ch. 1986 Atomic force microscope Phys. **56**, 930.
693. Dufrière, Y.F., *et al.* Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. **12**, 295 (2017).
694. Santos, N.C. & Carvalho, F.A. *Atomic Force Microscopy*, (Springer, 2019).
695. Mukherjee, R., Saha, M., Routray, A. & Chakraborty, C.J.I.t.o.n. Nanoscale surface characterization of human erythrocytes by atomic force microscopy: a critical review. **14**, 625-633 (2015).
696. Variola, F.J.P.C.C.P. Atomic force microscopy in biomaterials surface science. **17**, 2950-2959 (2015).
697. Cazaux, S., *et al.* Synchronizing atomic force microscopy force mode and fluorescence microscopy in real time for immune cell stimulation and activation studies. **160**, 168-181 (2016).
698. JPK Instrument AG. *NanoWizard® AFM Handbook.*, (2012).
699. Carvalho, F.A., *et al.* Atomic force microscopy-based molecular recognition of a fibrinogen receptor on human erythrocytes. **4**, 4609-4620 (2010).

700. Carvalho, F.A. & Santos, N.C.J.I.I. Atomic force microscopy-based force spectroscopy—biological and biomedical applications. **64**, 465-472 (2012).
701. Fotiadis, D.J.C.o.i.b. Atomic force microscopy for the study of membrane proteins. **23**, 510-515 (2012).
702. Carvalho, F.A., Freitas, T. & Santos, N.C.J.A.i.p.e. Taking nanomedicine teaching into practice with atomic force microscopy and force spectroscopy. **39**, 360-366 (2015).
703. Yeow, N., Tabor, R.F., Garnier, G.J.A.i.c. & science, i. Atomic force microscopy: From red blood cells to immunohaematology. **249**, 149-162 (2017).
704. Carvalho, F.A., Martins, I.C., Santos, N.C.J.A.o.b. & biophysics. Atomic force microscopy and force spectroscopy on the assessment of protein folding and functionality. **531**, 116-127 (2013).
705. Guedes, A.F., *et al.* Atomic force microscopy as a tool to evaluate the risk of cardiovascular diseases in patients. **11**, 687 (2016).
706. Carvalho, F.A., De Oliveira, S., Freitas, T., Gonçalves, S. & Santos, N.C.J.P.O. Variations on fibrinogen-erythrocyte interactions during cell aging. **6**, e18167 (2011).
707. Cox, T.R., Erler, J.T.J.D.m. & mechanisms. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. **4**, 165-178 (2011).
708. Yalow, R.S. & Berson, S.A.J.T.J.o.c.i. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. **39**, 1157-1175 (1960).
709. Lequin, R.M.J.C.c. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **51**, 2415-2418 (2005).
710. Engvall, E. & Perlmann, P.J.I. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. **8**, 871-874 (1971).
711. Leng, S.X., *et al.* ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. **63**, 879-884 (2008).
712. bio-rad- Multiplex Immunoassays.
713. Manual, B.-P.C.A.I. Bio-Plex Cytokine Assay. (ed. Bio-Rad).
714. Houser, B.J.A.o.p. & biochemistry. Bio-Rad's Bio-Plex® suspension array system, xMAP technology overview. **118**, 192-196 (2012).
715. Baskurt, O.K., Hardeman, M.R. & Rampling, M.W. *Handbook of hemorheology and hemodynamics*, (IOS press, 2007).
716. Neu, B., Wenby, R. & Meiselman, H.J.J.B.j. Effects of dextran molecular weight on red blood cell aggregation. **95**, 3059-3065 (2008).
717. Saldanha, C. Mini review on erythrocyte aggregation - Basic Concepts and Clinical Repercussions. *Boletim Hemorreologia* **2**, 1-10 (2002).
718. Lominadze, D. & Dean, W.L.J.F.I. Involvement of fibrinogen specific binding in erythrocyte aggregation. **517**, 41-44 (2002).

719. Rabai, M., *et al.* Deformability analysis of sickle blood using ektacytometry. **51**, 159-170 (2014).
720. Mohandas, N. & Shohet, S.J.C.i.h. The role of membrane-associated enzymes in regulation of erythrocyte shape and deformability. **10**, 223-237 (1981).
721. Alkuraishy, H.M., Al-Gareeb, A.I. & Albuhadilly, A.K.J.B.r.i. Vinpocetine and pyritinol: a new model for blood rheological modulation in cerebrovascular disorders—a randomized controlled clinical study. **2014**(2014).
722. Kim, Y., Kim, K. & Park, Y.J.B.C.A.O.o.S.i.H. Measurement techniques for red blood cell deformability: recent advances. **10**, 167-194 (2012).
723. Instruments, M.J.M. Zetasizer nano series user manual. **1**, 2004 (2004).
724. Fernandes, H.P., Cesar, C.L. & Barjas-Castro, M.d.L.J.R.b.d.h.e.h. Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation. **33**, 297-301 (2011).
725. Eylar, E.H., Madoff, M.A., Brody, O. & Oncley, J.J.J.o.B.C. The contribution of sialic acid to the surface charge of the erythrocyte. **237**, 1992-2000 (1962).
726. Freire, J.M., *et al.* Using zeta-potential measurements to quantify peptide partition to lipid membranes. **40**, 481-487 (2011).
727. Cedarbaum, J.M., *et al.* The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. **169**, 13-21 (1999).
728. Club Cell Protein (CC16) Human ELISA biovendor.
729. Wu, A.H. *Tietz clinical guide to laboratory tests-E-book*, (Elsevier Health Sciences, 2006).
730. Preeti, P., Suresh, J.N.J.I.J.o.M.R. & Sciences, H. Estimation of Serum Creatinine by Routine Jaffé's Method and by Dry Chemistry in Icteric and Hemolytic Serum Samples. **6**, 68-75 (2017).
731. Harrison, T.R., Kasper, D.L. & Fauci, A.S. *Harrison's Principles of Internal Medicine 19th Ed*, (McGraw-Hill AccessMedicine, 2015).
732. Farrell, D.H. GammaCoeur Semi-Automated ELISA Assay. Gamma Therapeutics. (2014).
733. Bernardes, N., *et al.* Modulation of membrane properties of lung cancer cells by azurin enhances the sensitivity to EGFR-targeted therapy and decreased β 1 integrin-mediated adhesion. **15**, 1415-1424 (2016).
734. Guedes, A.F., *et al.* AFM as a tool to evaluate the risk for cardiovascular diseases in patients. **50**, S1 (2018).

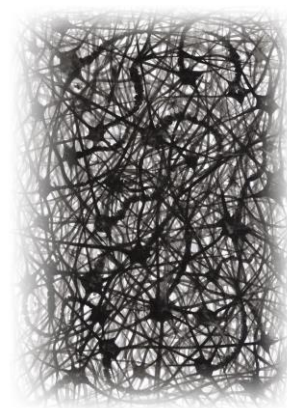
735. Santos, M.J., *et al.* Hemorheological parameters are related to subclinical atherosclerosis in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. **219**, 821-826 (2011).
736. Lima, C., *et al.* Identification of erythrocyte biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. **63**, 423-437 (2016).
737. Baskurt, O., *et al.* New guidelines for hemorheological laboratory techniques. (2009).
738. Pinto, A., *et al.* Nocturnal pulse oximetry: a new approach to establish the appropriate time for non-invasive ventilation in ALS patients. **4**, 31-35 (2003).
739. Broeckaert, F., Bernard, A.J.C., Allergy, e.a.j.o.t.B.S.f. & Immunology, C. Clara cell secretory protein (CC16): characteristics and perspectives as lung peripheral biomarker. **30**, 469-475 (2000).
740. Hasegawa, M., *et al.* Use of serum clara cell 16-kDa (CC16) levels as a potential indicator of active pulmonary fibrosis in systemic sclerosis. **38**, 877-884 (2011).
741. Anthony, D.C., Couch, Y., Losey, P., Evans, M.C.J.B., behavior, & immunity. The systemic response to brain injury and disease. **26**, 534-540 (2012).
742. Gil, J., *et al.* Causes of death amongst French patients with amyotrophic lateral sclerosis: a prospective study. **15**, 1245-1251 (2008).
743. Burkhardt, C., Neuwirth, C., Sommacal, A., Andersen, P.M. & Weber, M.J.P.O. Is survival improved by the use of NIV and PEG in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)? A post-mortem study of 80 ALS patients. **12**, e0177555 (2017).
744. Nicot, F., *et al.* Respiratory muscle testing: a valuable tool for children with neuromuscular disorders. **174**, 67-74 (2006).
745. Rideau, Y., Jankowski, L., Grellet, J.J.M. & Medicine, N.O.J.o.t.A.A.o.E. Respiratory function in the muscular dystrophies. **4**, 155-164 (1981).
746. Celli, B.R. & Owen, C.A.J.T.L.R.M. The club cell and its protein, CC16: time to shine. **1**, 757-759 (2013).
747. Calvo, A., Moglia, C., Balma, M., Chio, A.J.C. & Targets, N.D.-D. Involvement of immune response in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis: a therapeutic opportunity? **9**, 325-330 (2010).
748. Turner, M., *et al.* Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study. **15**, 601-609 (2004).
749. Chiu, I.M., *et al.* T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS. **105**, 17913-17918 (2008).
750. Banerjee, R., *et al.* Adaptive immune neuroprotection in G93A-SOD1 amyotrophic lateral sclerosis mice. **3**, e2740 (2008).

751. Beers, D.R., *et al.* Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **134**, 1293-1314 (2011).
752. Henkel, J.S., *et al.* Regulatory T-lymphocytes mediate amyotrophic lateral sclerosis progression and survival. **5**, 64-79 (2013).
753. Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M. & Taga, T.J.B. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. **86**, 1243-1254 (1995).
754. Pedersen, B.K. & Febbraio, M.A.J.P.r. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. **88**, 1379-1406 (2008).
755. Ali, C., *et al.* Ischemia-induced interleukin-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain. **20**, 956-966 (2000).
756. Trujillo, M.E., *et al.* Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. **89**, 5577-5582 (2004).
757. Shafeeq Ladha, M.P.B.N.I. A Phase 2 Randomized, Placebo Controlled Trial of Tocilizumab in ALS Subject A Trial of Tocilizumab in ALS Subjects (TCZALS-001).NCT02469896 (July 11, 2018).
758. Ershler, W.B.J.J.o.t.A.G.S. Interleukin-6: A Cytokine for Gerontologists. **41**, 176-181 (1993).
759. Maggio, M., Guralnik, J.M., Longo, D.L., Ferrucci, L.J.T.J.o.G.S.A.B.S. & Sciences, M. Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway. **61**, 575-584 (2006).
760. Vgontzas, A.N., *et al.* IL-6 and its circadian secretion in humans. **12**, 131-140 (2005).
761. Marin, B., *et al.* Variation in worldwide incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. **46**, 57-74 (2017).
762. Andreev, E., Koopman, M. & Arisz, L.J.J.o.i.m. A rise in plasma creatinine that is not a sign of renal failure: which drugs can be responsible? **246**, 247-252 (1999).
763. Samra, M. & Abcar, A.C.J.T.P.J. False estimates of elevated creatinine. **16**, 51 (2012).
764. Peixoto, L., *et al.* Cystatin C: A Promising Marker of Renal Function in Patients with Systemic Lupus Erythematosus? **28**, 333-341 (2015).
765. Tetsuka, S., Morita, M., Ikeguchi, K., Nakano, I.J.N. & Neuroscience, C. Creatinine/cystatin C ratio as a surrogate marker of residual muscle mass in amyotrophic lateral sclerosis. **1**, 32-37 (2013).
766. Wang, M.-D., Little, J., Gomes, J., Cashman, N.R. & Krewski, D.J.N. Identification of risk factors associated with onset and progression of amyotrophic lateral sclerosis using systematic review and meta-analysis. **61**, 101-130 (2017).

767. Moglia, C., *et al.* Early weight loss in amyotrophic lateral sclerosis: outcome relevance and clinical correlates in a population-based cohort. **90**, 666-673 (2019).
768. Leonardis, L., Dolenc Grošelj, L. & Vidmar, G.J.E.j.o.n. Factors related to respiration influencing survival and respiratory function in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a retrospective study. **19**, 1518-1524 (2012).
769. Rooney, J., Burke, T., Vajda, A., Heverin, M. & Hardiman, O.J.J.N.N.P. What does the ALSFRS-R really measure? A longitudinal and survival analysis of functional dimension subscores in amyotrophic lateral sclerosis. **88**, 381-385 (2017).
770. Schuster, C., Hardiman, O. & Bede, P.J.B.n. Survival prediction in Amyotrophic lateral sclerosis based on MRI measures and clinical characteristics. **17**, 73 (2017).
771. Knibb, J.A., *et al.* A clinical tool for predicting survival in ALS. **87**, 1361-1367 (2016).
772. Allen, J.D., Wilson, J.B., Tulley, R.T., Lefevre, M. & Welsch, M.A.J.T.A.j.o.c. Influence of age and normal plasma fibrinogen levels on flow-mediated dilation in healthy adults. **86**, 703-705, A709 (2000).
773. Fowkes, F.G.R., Lee, A.J., Lowe, G.D., Riemersma, R.A. & Housley, E.J.J.o.c.r. Interrelationships of plasma fibrinogen, low-density lipoprotein cholesterol, cigarette smoking and the prevalence of cardiovascular disease. **3**, 307-312 (1996).
774. Schreiner, P.J., Appiah, D., Folsom, A.R.J.B.c., haemostasis, f.a.i.j.i. & thrombosis. Gamma prime (γ') fibrinogen and carotid intima-media thickness: the Atherosclerosis Risk in Communities study. **28**, 665-669 (2017).
775. Lovely, R., *et al.* Obesity-related increased γ' fibrinogen concentration in children and its reduction by a physical activity-based lifestyle intervention: a randomized controlled study. **163**, 333-338 (2013).
776. Altieri, D., Plescia, J. & Plow, E.J.J.o.B.C. The structural motif glycine 190-valine 202 of the fibrinogen gamma chain interacts with CD11b/CD18 integrin (alpha M beta 2, Mac-1) and promotes leukocyte adhesion. **268**, 1847-1853 (1993).
777. Davalos, D. & Akassoglou, K. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. in *Seminars in immunopathology*, Vol. 34 43-62 (Springer, 2012).
778. Tang, L., Ugarova, T.P., Plow, E.F. & Eaton, J.W.J.T.J.o.c.i. Molecular determinants of acute inflammatory responses to biomaterials. **97**, 1329-1334 (1996).
779. Maeda, N., Seike, M., Kume, S., Takaku, T. & Shiga, T.J.B.e.B.A.-B. Fibrinogen-induced erythrocyte aggregation: erythrocyte-binding site in the fibrinogen molecule. **904**, 81-91 (1987).
780. Delamaire, M. & Durand, F.J.J.d.m.v. Erythrocyte aggregation and vascular pathology. **15**, 344-345; discussion 345-346 (1990).
781. Saldanha, C.J.C. & Investigations, M. Lipoproteins effects on erythrocyte nitric oxide metabolism and biorheology. **2**, 1-5 (2017).

782. Saldanha, C., Lopes de Almeida, J., Freitas, T., Oliveira, S. & Silva-Herdade, A.S.J.S.o.B. Erythrocyte deformability responses to shear stress under external and internal stimuli influences. 54-60 (2010).
783. Galletti, P., *et al.* Accumulation of altered aspartyl residues in erythrocyte proteins from patients with Down's syndrome. **274**, 5263-5277 (2007).
784. D'Angelo, S., *et al.* Accumulation of altered aspartyl residues in erythrocyte membrane proteins from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **63**, 626-634 (2013).
785. Shin, S., Ku, Y., Babu, N. & Singh, M. Erythrocyte deformability and its variation in diabetes mellitus. (2007).
786. Lekka, M., *et al.* Erythrocyte stiffness probed using atomic force microscope. **42**, 307-317 (2005).
787. Santacruz-Gomez, K., *et al.* An AFM approach of RBC micro and nanoscale topographic features during storage. **8**, 478-481 (2014).
788. Pretorius, E.J.C.h. & microcirculation. Erythrocyte deformability and eryptosis during inflammation, and impaired blood rheology. **69**, 545-550 (2018).
789. Mohanty, J.G., *et al.* Alterations in the red blood cell membrane proteome in alzheimer's subjects reflect disease-related changes and provide insight into altered cell morphology. **8**, 11 (2010).
790. Calvo, A., *et al.* Factors predicting survival in ALS: a multicenter Italian study. **264**, 54-63 (2017).
791. Ikeda, K., Kawabe, K. & Iwasaki, Y.J.J.o.t.n.s. Do serum uric acid levels reflect oxidative stress in the progression of ALS? **287**, 294 (2009).
792. Dorst, J., *et al.* Patients with elevated triglyceride and cholesterol serum levels have a prolonged survival in amyotrophic lateral sclerosis. **258**, 613-617 (2011).
793. Veyrat-Durebex, C., *et al.* Iron metabolism disturbance in a French cohort of ALS patients. **2014**(2014).
794. Steinacker, P., *et al.* Diagnostic and prognostic significance of neurofilament light chain NF-L, but not progranulin and S100B, in the course of amyotrophic lateral sclerosis: data from the German MND-net. **18**, 112-119 (2017).
795. Oeckl, P., *et al.* Multicenter validation of CSF neurofilaments as diagnostic biomarkers for ALS. **17**, 404-413 (2016).
796. Mandrioli, J., *et al.* Changes in routine laboratory tests and survival in amyotrophic lateral sclerosis. **38**, 2177-2182 (2017).
797. Gyawali, P., Richards, R.S., Bwititi, P.T., Nwose, E.U.J.B.C., *Molecules, & Diseases.* Association of abnormal erythrocyte morphology with oxidative stress and inflammation in metabolic syndrome. **54**, 360-363 (2015).

ANEXOS



Artigo 1

Plasma level of club-cell (CC-16) predicts outcome in amyotrophic lateral sclerosis

Accepted: 12 September 2017


DOI: 10.1111/ane.12851

ORIGINAL ARTICLE

WILEY

Annals
Neurologica
Scientifica

Plasma level of club-cell (CC-16) predicts outcome in amyotrophic lateral sclerosis

A. C. Pronto-Laborinho¹ | M. Gromicho¹ | M. Pereira¹ | S. Pinto¹ | M. do A. Barros¹ |
M. Swash^{1,2} | M. de Carvalho^{1,3} 

Plasma level of club-cell (CC-16) predicts outcome in amyotrophic lateral sclerosis

A. C. Pronto-Laborinho¹ | M. Gromicho¹ | M. Pereira¹ | S. Pinto¹ | M. do A. Barros¹ | M. Swash^{1,2} | M. de Carvalho^{1,3} 

¹Institute of Physiology and Institute of Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Lisbon, Lisbon, Portugal

²Barts and the London School of Medicine, Queen Mary University of London, London, UK

³Department of Neurosciences and Mental Health, Hospital de Santa Maria-CHLN, Lisbon, Portugal

Correspondence

M. de Carvalho, Institute of Physiology, Faculty of Medicine, University of Lisbon, Lisbon, Portugal.
Email: mamedemg@mail.telepac.pt

Funding information

This work was partially supported by ONWebDuals (JPND-PS/0001/2013), an EU Joint Program-Neurodegenerative Disease Research (JPND) project. The project is supported through the following funding organization under the aegis of JPND—www.jpnd.eu: Germany, Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF); Poland, Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR); Portugal, Fundação a Ciência e a Tecnologia (FCT); Sweden, Vetenskapsrådet (VR).

Objectives: The club cell protein (CC-16) is a biomarker associated with respiratory distress and pulmonary inflammation. We evaluated CC-16 as a candidate biomarker for respiratory failure in amyotrophic lateral sclerosis (ALS).

Materials and Methods: We studied 81 ALS patients and 30 matched controls. We used an ALS-related measure of functional capacity, and tested forced vital capacity (FVC) and the amplitude of the diaphragmatic response by phrenic nerve stimulation (PhrenAmpl). Plasma CC-16 levels were measured in venous blood. Kaplan-Meier survival curves were plotted to evaluate risk to non-invasive ventilation and death in patients with abnormal CC-16 levels.

Results: CC-16 levels were significantly raised in ALS patients (10.56 ng/mL ± 6.84 vs 8.34 ng/mL ± 3.10, $P = .02$), and in 17% of them, CC-16 level was above the upper cutoff value (mean + 2.5SD). CC-16 levels did not correlate with age, onset region, disease duration, functional status, FVC, and PhrenAmpl. In patients with increased CC-16 level, the risk of non-invasive was greater in the following 6 months ($P = .01$) and tended to have higher mortality in the following 30 months ($P = .07$).

Conclusions: We propose that increased CC-16 levels is a marker of lung inflammatory response that associated with ventilatory insufficiency are related to impending respiratory failure, not fully predicted by conventional respiratory tests. The latter are limited by the moment of testing.

KEYWORDS

amyotrophic lateral sclerosis, biomarker, human club cell CC-16, respiratory function, respiratory insufficiency

1 | INTRODUCTION

Club cell secretory protein (CC-16) is a protein synthesized predominantly in the lungs and measurable in serum. It is a member of the secretoglobulin family, secreted by a group of cells localized in tracheobronchial epithelium, chiefly in the terminal bronchioles. CC-16 protein has a low molecular weight and consists of 2 polypeptide chains, each with 70-77 amino acids.¹⁻³ Several studies have demonstrated that it has immunomodulatory, anti-allergic, antichemotactic, and anti-inflammatory properties.^{4,5} Moreover, CC-16 protein is a sensitive

biomarker of airway epithelial integrity, being increased in acute pulmonary infections, in the presence of accelerated lung function decline and in severe chronic obstructive pulmonary diseases.^{6,7} However, it tends to decrease during chronic respiratory illnesses, associated with a reduction in club cells.⁷

In amyotrophic lateral sclerosis (ALS), although a number of respiratory tests are sensitive in detecting ventilatory dysfunction and therefore indicating prognosis,⁸⁻¹⁰ no molecular biomarker of respiratory failure has yet been identified. Such a biomarker would be particularly useful in clinical practice, as classic respiratory tests are limited

by oro-facial weakness and consequent difficulty in cooperation,^{10,11} as well as by their inevitable dependence on the moment of testing. We present our studies of CC-16 as a biomarker of respiratory failure in a large population of ALS patients.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Patients and normal subjects

We studied 81 consecutive ALS patients observed in our center, 45 of whom were men and 36 were women, with a mean age of 60 years (SD = 11.4, range 28-83 years), and a mean disease duration 27 months (SD = 43.4, range 4-335 months). In this group, 61 patients had spinal, 16 bulbar, and 4 respiratory-onset ALS. All these patients had probable or definite ALS according to the revised El Escorial criteria,¹² and the EMG findings were consistent with the Awaji criteria.¹³ Patients with clinical evidence of dementia, incidental heart or lung disorders, or signs of respiratory infection were excluded. Smokers were considered not eligible as this could influence results.⁴ No included patient was on non-invasive ventilation or gastrostomized, but all of them were taking riluzole.

Patients were clinically evaluated at the time of blood sampling, using ALSFRS-R, respiratory subscore of ALSFRS-R (R subscore), forced vital capacity (FVC), and compound muscle action potential amplitude of the diaphragm after phrenic nerve transcutaneous electrical stimulation of the nerve (PhrenAmpl). These measurements were correlated with laboratory findings.

In the same period and using the same methodology, we studied 30 age and sex-matched ($P > .1$) non-smoker healthy controls to define our own normative values.

2.2 | Tests and measurements

Forced vital capacity was determined with patients in the sitting position using a computer-based USB spirometer (Cosmed® Inc, Chicago, IL, USA). The best of 3 satisfactory tests was used to define FVC. Predicted values (%) were used for the analyses.

The amplitude of the diaphragmatic muscle response to phrenic nerve stimulation (PhrenAmpl) was obtained by percutaneous bipolar electrical stimulation of the phrenic nerves at the neck, using surface recording electrodes positioned over the surface marking of the diaphragm on each side.⁹⁻¹⁴ Phrenic nerve stimulation was performed bilaterally, and the mean value of the amplitude of both sides (peak-to-peak and peak-to-baseline) was used in the analysis.⁹⁻¹⁴

To determine plasma CC-16 levels, whole venous blood was collected into vacutainer tubes (lithium heparin tubes) and immediately centrifuged. The plasma was collected and stored at -80°C until analyzed. Human plasma CC-16 concentrations were measured using the Human Clara Cell Protein enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit, quantitative colorimetric sandwich ELISA kits (BioVendor, Modrice, Czech Republic) following the manufacturer's instructions.¹⁵ Plasma samples were diluted 25-fold with the dilution buffer supplied

TABLE 1 Results

	Mean age (range)	Gender (M/F)	Onset: spinal/ bulbar/ respiratory	Mean disease duration (range) (mo)	Mean ALSFRS-R (range)	Mean R subscore (range)	Mean FVC (% predicted) (range)	Mean PhrenAmpl (mV) (range)	Mean CC-16 protein (ng/mL) (range)
ALS patients N = 81	60.1 ± 11.4 (28-83)	45/36	61/16/4	27.0 ± 43.4 (4-335)	38.7 ± 8.8 (11-46)	11.29 ± 1.1 (6-12)	84.6 ± 24.2 (21-137)	0.54 ± 0.22 (0.13-1.19)	10.56 ± 6.84 (2.9-37.63)*
Controls N = 30	53.7 ± 7.7 (28-65)	17/13	-	-	-	-	-	>0.4 mV	8.34 ± 3.10 (3.41-17.18)*

ALS, amyotrophic lateral sclerosis; M, male; F, female; ALSFRS-R, amyotrophic lateral sclerosis functional rating scale-revised; FVC, forced vital capacity.

* $P = .02$.

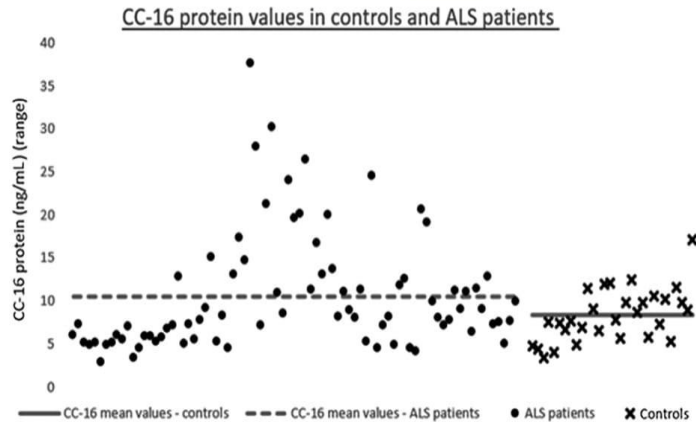


FIGURE 1 It represents single CC-16 level from controls and ALS patients, and the mean value in each population

by the manufacturer. Each sample was run in duplicate, and the mean concentration was calculated. CC-16 concentration was determined by comparison with a standard curve prepared with known concentrations of the protein.

2.3 | Statistics

The data distribution was tested by the Shapiro-Wilk test. Comparisons were carried out with Chi-squared tests for categorical data and unpaired t tests for continuous measurements. Pearson's correlation coefficient was applied to test correlation between data. Kaplan-Meier plots were performed to evaluate prognostic value of abnormal CC-16 level.

2.4 | Ethics

All subjects gave written informed consent. The study conformed to the standards defined in the latest revision of the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the Local Ethics Committee.

3 | RESULTS

Table 1 summarizes the results. The histogram of results from controls suggested a normal distribution, confirmed by the Shapiro-Wilk test ($P = .29$). The mean CC-16 concentration was 8.34 ng/mL (SD = 3.10, range 3.41-17.18). The upper limit of normal was set as 16.09 ng/mL (mean + 2.5 SD). In the ALS population, the mean CC-16 concentration value was 10.56 ng/mL (SD = 6.84, range 2.9-37.63), significantly higher than the control values ($P = .02$) (Figure 1). Fourteen ALS patients (17%) had CC-16 level above the defined upper limit value. CC-16 levels did not correlate with age ($r = .21, P = .07$), disease duration ($r = .05, P = .6$), ALSFRS-R ($r = .09, P = .5$), disease progression rate as measured by ALSFRS-R decline/month ($r = .19, P = .4$), R (respiratory) subscore ($r = .12, P = .3$), FVC ($r = .19, P = .8$), and PhrenAmpl (peak-to-peak amplitude and peak-to-baseline amplitude, $r = .06, P = .6$). The mean disease duration was similar in the group of patients with high CC-16 values (mean

26 months) and the group of patients with normal CC-16 value (mean 27 months). There was no difference in the CC-16 levels between spinal and bulbar-onset patients ($P = .16$).

In the 6-month period after inclusion in the study, 7 of the 14 patients (50%) with abnormal CC-16 level required non-invasive ventilation as compared to 12 of the remaining 67 patients (17.9%), a significant difference on Kaplan-Meier statistics ($P = .01$) (Figure 2). In this period, 2 patients died in each group, which represents a 5-fold greater risk of patients with high CC-16 levels. We analyzed survival curves for the period 30 months after blood sampling. In this period, 45 patients died. In 28 (62%) of these, death followed bronchopneumonia and/or aspiration pneumonia. Eleven of the 45 deaths occurred in the 14 patients with high CC-16 level (79%) and 34 (51%) in the group of 67 patients with normal CC-16 level ($P = .001$, on Chi-square). On Kaplan-Meier survival curves, there was a non-significant difference ($P = .07$) indicating a trend for high CC-16 level as a poor prognostic biomarker for survival (Figure 3).

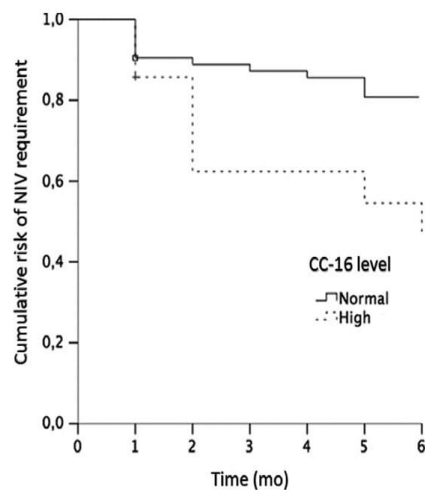


FIGURE 2 Kaplan-Meier plot showing that high levels of CC-16 are a prognostic indicator of non-invasive ventilator requirement in the following 6-month period ($P = .01$)

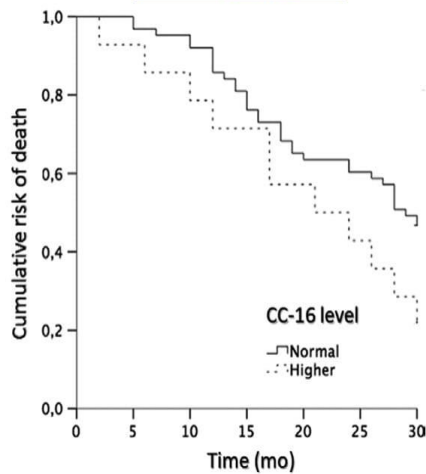


FIGURE 3 Survival curves according to CC-16 level, high level tends to be associated with a poor prognosis ($P = .07$)

4 | DISCUSSION

Plasma CC-16 is a lung-derived protein, measurable in plasma of venous blood, which has been proposed as a biomarker for pulmonary dysfunction. Its plasma level is not influenced by age, gender, or body mass index.^{6-14,16,17} In our study, CC-16 levels in controls were similar to the values reported by other groups in healthy non-smokers.^{6,7,17} Plasma CC-16 levels were significantly higher in ALS patients, but we found no correlation with gender, age, region of onset, disease duration, ALS functional score, rate of functional decline, respiratory symptoms, FVC, and electrophysiological studies of phrenic nerve-diaphragm function. However, the subgroup of ALS patients with abnormal levels of CC-16 showed more rapid progression, with an increased probability of requiring non-invasive ventilation within 6 months and a higher mortality risk within this period of time. Over a longer follow-up, the number of deaths was enough to investigate the survival risk with Kaplan-Meier statistics. Using this method, there was a strong, but non-significant, trend suggesting that a raised CC-16 level may be a poor prognostic factor for survival in ALS.

Blood CC-16 levels are increased in pulmonary inflammatory conditions,^{6,7,17} and also in the active phase of pulmonary fibrosis associated with systemic sclerosis.¹⁸ Neuroinflammation is a critical factor in the pathogenesis of ALS, and many inflammatory biomarkers have been recognized in this disease.¹⁹⁻²² In particular, interleukin-6 was found to be increased in the late stages of the disease.²² There is evidence that a systemic inflammatory response can be associated with central nervous system inflammation in neurodegenerative processes, possibly accelerating disease course.²³

In epidemiologic studies, respiratory failure is the main cause of death in ALS.²⁴ However, the most common precipitant event for respiratory failure in the disease is pulmonary infection.^{15,25} In contrast to patients with other neuromuscular disorders who can survive with very poor ventilatory function,^{26,27} patients with ALS frequently die with reasonable voluntary lung volumes, suggesting that the increased

metabolic demand of a concomitant inflammatory condition can decompensate respiratory function.

The most likely explanation for our findings is that respiratory distress related to impending respiratory failure caused higher plasma CC-16 levels in our ALS patients. This marker for respiratory failure is not related to respiratory muscle strength as detected by conventional respiratory tests. Pulmonary interstitial inflammation due to microaspiration or poor ventilation of some lung areas is a cause of clinical deterioration in ALS,²⁸ and possibly, CC-16 levels reflect this process.²⁹ This test may therefore have potential utility as a biomarker of impending ventilatory failure in ALS.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to all participant patients and controls.

CONFLICT OF INTEREST

The authors report no conflict of interests.

ORCID

M. de Carvalho  <http://orcid.org/0000-0001-7556-0158>

REFERENCES

- Widdicombe JG, Pack RJ. The Clara cell. *Eur J Respir Dis.* 1982;63:202-220.
- Shijubo N, Kawabata I, Sato N, Itoh Y. Clinical aspects of Clara cell 10-kDa protein/uteroglobin (secretoglobin 1A1). *Curr Pharm Des.* 2003;9:1139-1149.
- Hantson P, Bernard A, Hermans C. Kinetics and determinants of the changes of CC16, a lung secretory protein in a rat model of toxic lung injury. *Clin Toxicol (Phila).* 2008;46:230-238.
- Mukherjee AB, Kundu GC, Mantile-Selvaggi G, et al. Uteroglobin: a novel cytokine? *Cell Mol Life Sci.* 1999;55:771-787.
- Yoon JM, Lee KH, Lee S, et al. The immune modulation of Clara cell-10 in human peripheral monocytes and dendritic cells. *Int J Mol Med.* 2010;26:415-423.
- Wutzler S, Backhaus L, Henrich D, et al. Clara cell protein 16: a biomarker for detecting secondary respiratory complications in patients with multiple injuries. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012;73:838-842.
- Ishikawa N, Hattori N, Kohno N, Kobayashi A, Hayamizu T, Johnson M. Airway inflammation in Japanese COPD patients compared with smoking and nonsmoking controls. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2015;10:185-192.
- Czaplinski A, Yen AA, Appel SH. Forced vital capacity (FVC) as an indicator of survival and disease progression in an ALS clinic population. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006;77:390-392.
- Pinto S, Pinto A, de Carvalho M. Phrenic nerve studies predict survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol.* 2012;123:2454-2459.
- Pinto S, de Carvalho M. Breathing new life into treatment advances for respiratory failure in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurodegen Dis Manag.* 2014;4:83-102.
- Stambler N, Charatan M, Cedarbaum JM. Prognostic indicators of survival in ALS. *Neurology.* 1998;50:66-72.
- Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. El Escorial

- revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*. 2000;1:293-299.
13. De Carvalho M, Dengler R, Eisen A, et al. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clin Neurophysiol*. 2008;119:497-503.
 14. Pinto S, Turkman A, Pinto A, Swash M, de Carvalho M. Predicting respiratory insufficiency in amyotrophic lateral sclerosis: the role of phrenic nerve studies. *Clin Neurophysiol*. 2009;120:941-946.
 15. www.biovendor.com/country20/product/immunoassays/clara-cell-protein-human-elisa.
 16. Broeckaert F, Bernard A. Clara cell secretory protein (CC16); characteristics and perspectives as lung peripheral biomarker. *Clin Exp Allergy*. 2000;30:469-475.
 17. Hasegawa M, Fujimoto M, Hamaguchi Y, et al. Use of serum clara cell 16-kDa (CC16) levels as a potential indicator of active pulmonary fibrosis in systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2011;38:877-884.
 18. McGeer PL, McGeer EG. Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 2002;26:459-470.
 19. Palma AS, de Carvalho M, Grammel N, et al. Proteomic analysis of plasma from Portuguese patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*. 2008;9:339-349.
 20. Evans MC, Couch Y, Sibson N, Turner MR. Inflammation and neurovascular changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Cel Neurosci*. 2013;53:34-41.
 21. Lu CH, Allen K, Oei F. Systemic inflammatory response and neuromuscular involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2016;3:e244.
 22. Anthony DC, Couch Y, Losey P, Evans MC. The systemic response to brain injury and disease. *Brain Behav Immun*. 2012;26:534-540.
 23. Gil J, Funalot B, Verschueren A, et al. Causes of death amongst French patients with amyotrophic lateral sclerosis: a prospective study. *Eur J Neurol*. 2008;15:1245-1251.
 24. Corcia P, Pradat PF, Salachas F, et al. Causes of death in a post-mortem series of ALS patients. *Amyotroph Lateral Scler*. 2008;9:59-62.
 25. Burkhardt C, Neuwirth C, Sommacal A, Andersen PM, Weber M. Is survival improved by the use of NIV and PEG in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)? A post-mortem study of 80 ALS patients. *PLoS One*. 2017;12:e0177555.
 26. Rideau Y, Jankowski LW, Grellet J. Respiratory function in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve*. 1981;4:155-164.
 27. Nicot F, Hart N, Forin V, et al. Respiratory muscle testing: a valuable tool for children with neuromuscular disorders. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174:67-74.
 28. Leigh PN, Abrahams S, Al-Chalabi A, et al. The management of motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74(Suppl 4):iv32-iv47.
 29. Celli BR, Owen CA. The club cell and its protein, CC16: time to shine. *Lancet Respir Med*. 2013;1:757-759.

How to cite this article: Pronto-Laborinho A, Gromicho M, Pereira M, et al. Plasma level of club cell (CC-16) predicts outcome in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2018;137:233-237. <https://doi.org/10.1111/ane.12851>

Artigo 2

Interleukin-6 and amyotrophic lateral sclerosis

Journal of the Neurological Sciences 398 (2019) 50–53



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of the Neurological Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jns



Interleukin-6 and amyotrophic lateral sclerosis

Ana Pronto-Laborinho^a, Susana Pinto^a, Marta Gromicho^a, Mariana Pereira^a, Michael Swash^{a,c},
Mamede de Carvalho^{a,b,*}



^a Institute of Physiology and Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Portugal

^b Department of Neurosciences and Mental Health, Hospital de Santa Maria-CHLN, Lisbon, Portugal

^c Barts and the London School of Medicine, Queen Mary University of London, United Kingdom



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of the Neurological Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jns

Interleukin-6 and amyotrophic lateral sclerosis

Ana Pronto-Laborinho^a, Susana Pinto^a, Marta Gromicho^a, Mariana Pereira^a, Michael Swash^{a,c}, Mamede de Carvalho^{a,b,*}^a Institute of Physiology and Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Portugal^b Department of Neurosciences and Mental Health, Hospital de Santa Maria-CHLN, Lisbon, Portugal^c Barts and the London School of Medicine, Queen Mary University of London, United Kingdom

ARTICLE INFO

Keywords:
Amyotrophic lateral sclerosis
Biomarker
Interleukin-6
Respiratory function
Respiratory insufficiency

ABSTRACT

Background: IL-6 is an inflammatory cytokine that is a possible factor in progression of the disease. We have investigated venous blood levels of IL-6 in controls and ALS patients in relation to clinical staging and respiratory function.

Methods: We studied 82 patients with ALS and 43 age and gender-matched healthy control subjects. Blood was drawn at the same time of day in the mornings to avoid diurnal variation. IL-6 levels were estimated according to a fixed protocol. Clinical measures included ALSFRS-R, vital capacity, and mean bilateral phrenic nerve CMAP amplitude. A multi-regression data analysis was used in addition to conventional statistical methods.

Results: IL-6 levels were positively correlated with increasing age in the control group. In ALS patients mean IL-6 levels were raised but the levels were markedly variable from case to case and did not reach significance ($p > 0.1$). In addition to age effects reduction in phrenic nerve CMAP amplitude was correlated with increased IL-6 levels ($p = 0.026$).

Conclusions: IL-6 levels were physiologically influenced by aging in controls and by respiratory dysfunction in ALS. There was marked variability in levels from case to case, which might be related to respiratory factors, which cause pulmonary inflammation.

1. Introduction

Interleukin-6 (IL-6) is multifunctional cytokine involved in the regulation of the immune response, inflammation, metabolism and hematopoiesis, produced by immune and blood cells, endothelial cells, and myocytes on contraction [1], which can cross the blood-brain barrier [2] and has been extensively investigated in neurodegenerative disorders.

A number of previous studies have reported increased serum and CSF levels of IL-6 in patients with ALS, probably related to the well-described role of inflammatory processes in motor neuron degeneration [3–7]. Studies of skin biopsies in ALS patients have demonstrated higher IL-6 immunoreactivity as compared with diseased control subjects. IL-6 immunoreactivity was markedly positive in the epidermis and dermal blood vessels, in particular in patient with longer disease duration, showing correlation with serum levels [8]. However, abnormal levels were not consistently found, some authors reporting values similar to controls [9]. In a study of ALS patients tested over a 4 year period, IL-6 plasma levels were strongly associated with C-reactive protein levels [10]. Moreover, from the large set of neuro-

inflammatory markers investigated, it was the only marker undergoing a late-stage upregulation [6]. There was no correlation between ALSFRS-R change and IL-6 levels [6] although other investigators noted higher levels of IL-6 at disease onset and decreased levels later [10]. Hypoxia is a factor that is possibly associated with greater IL-6 release in ALS and other medical conditions [4], such as occurs in obstructive sleep apnea [11]. Serum and CSF levels of IL-6 were found to correlate with PaO₂ in ALS [4]. This may be explained by the release of proinflammatory cytokines by hypoxia-induced microglia activation [12].

2. Material and methods

2.1. Patients and controls

We assayed IL-6 in plasma samples from 82 patients with ALS observed in our center and in 43 gender and age-matched healthy controls. Controls and patients older than 80 years were excluded. Patients with other medical or neurological conditions, eg diabetes, peripheral neuropathy and dementia were excluded. None required ventilator assistance.

* Corresponding author at: Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Av. Professor Egas Moniz, 1648-028 Lisbon, Portugal.
E-mail addresses: mamedemg@mail.telepac.pt, mamedemg@netcabo.pt (M. de Carvalho).

<https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.01.026>

Received 28 October 2018; Received in revised form 24 December 2018; Accepted 15 January 2019

Available online 16 January 2019

0022-510X/ © 2019 Published by Elsevier B.V.

Table 1

Results.

	IL-6 levels (pg/ml) mean (SD)	M/F ratio	Mean age (SD)	Mean disease duration (SD)	Region onset (bulbar and spinal)	Mean ALSFRS-R (SD)	Mean predicted FVC (SD)	Mean phrenic ampl (SD)
Controls (43)	2.23 (1.61)	1.42	57.7 (8.9)	–	–	–	–	–
ALS patients (82)	5.53 (12.94)	1.43	60.5 (9.9)	27.5 months (43.7)	17 bulbar 65 spinal	39.2 (7.7)	85–4 (22.9)	0.53 (0.22)
P values	0.1	0.9	0.22	–	–	–	–	–

FVC – forced vital capacity; Phrenic ampl – mean value of bilateral phrenic nerve peak-to-peak amplitude of the motor response (normal ≥ 0.4 mV).

All these patients had probable or definite ALS according to the revised El Escorial [13], and had neurophysiological changes according to Awaji criteria [14]. The patients with ALS were evaluated clinically (see below) at the same visit as the blood samples were taken.

2.2. Tests and measurements

To quantify the IL-6 plasma levels, whole venous blood was collected in vacutainer tubes (lithium heparin tubes) and immediately centrifuged. The plasma was collected and stored at -80°C until analyzed. Human plasma IL-6 concentrations were measured using Bio-Plex Pro Chemokine assay (Biorad Bio-Rad® Bio-Plex Pro™) performed according to the manufacturer's instructions using a Bio-Plex 200 system and the Bio-Plex Manager 5 software (all from Bio-Rad). For the measurement of IL-6 plasma levels, whole venous blood was collected into vacutainer tubes (lithium heparin tubes) and immediately centrifuged. The plasma was collected and stored at -80°C until analyzed. Human plasma IL-6 concentrations were measured using the Bio-Plex Pro™ Human Chemokine assay performed according to the manufacturer's instructions. Measurement of IL-6 was performed in duplicate for each sample and the mean concentration was calculated. The concentration of IL-6 was obtained by interpolating fluorescence intensity to the 7-point standard curve generated using recombinant protein supplied in the kit and calculated using the software Bio-Plex Manager 5.

a) Clinical evaluation

All the ALS patients were evaluated with the ALS functional rating scale, revised (ALSFRS-R).

b) Respiratory function tests

For each patient respiratory function tests were performed using the same technique and by the same technicians, always using nose clips for nose occlusion. Forced Vital Capacity (FVC) was determined with patients in the sitting position, using a computer-based spirometer (microQuark®, Cosmed®). The best of three satisfactory and consistent expiratory manoeuvres, each obtained after a maximal inspiratory effort, was used to determine the values of FVC. The predicted FVC% was used for statistical analysis.

Phrenic nerve conduction was evaluated bilaterally with surface recordings in all subjects. Motor responses were elicited by percutaneous electrical supramaximal stimulation in the neck, and recorded at the homolateral costosternal angle (active electrode), with the reference electrode at the costal margin 16 cm from the active electrode [16].

We recorded the time of non-invasive ventilation adaption (NIV) in the population of ALS patients, as decided by the team of specialists involved in the respiratory care and independent from this study.

2.3. Statistical methods

Control and ALS patient data was compared using the Student *t*-test or Chi square test for discrete variables. Since IL-6 levels were not

normally distributed we performed a log transformation for comparisons, correlations (Pearson correlation coefficient) and multiple regression analysis. A *p* value lower than 0.05 was considered significant.

2.4. Ethics

All subjects gave their written informed consent. The study conformed to the standards defined in the latest revision of the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the Local Ethics Committee.

3. Results

The results are summarised in Table 1. In control subjects there was no difference in IL-6 levels between genders (*p* 0.8). However, there was a positive correlation between age and IL-6 levels ($r = 0.45$, *p* 0.003): 30% of the increase in IL-6 levels in the healthy controls was dependent on increasing age. In the ALS patients there was a trend for IL-6 levels to be increased compared with healthy controls, despite the same age distribution in the two groups, but this did not reach statistical significance (Table 1; Fig. 1). In the ALS patients, there was no difference between bulbar-onset (17 subjects, mean 2.90 pg/ml, SD 1.79) vs spinal-onset patients (65 subjects, mean 2.13 pg/ml, SD 10.87, *p* 0.33), the IL-6 level was not correlated with disease duration (*p* 0.78) or ALSFRS-R (*p* 0.09), but it was negatively correlated with FVC ($r = 0.35$, *p* 0.04), and with mean bilateral phrenic nerve evoked potential amplitude (phrenic ampl) ($r = 0.33$, *p* 0.006), and positively correlated with age ($r = 0.4$, *p* < 0.001). Using a multiple regression model the only independent factor in addition to age was phrenic nerve amplitude (*p* 0.026) (Fig. 2).

In this ALS population, the time of NIV initiation was recorded in 77 out the 82 patients included, it was uncertain in the remaining 5. Within the time interval of 6 months after blood sampling, 33 patients required NIV, but 44 did not receive this medical indication. The mean IL-6 value was 8.93 pg/ml (SD = 2.17) in the former group, and

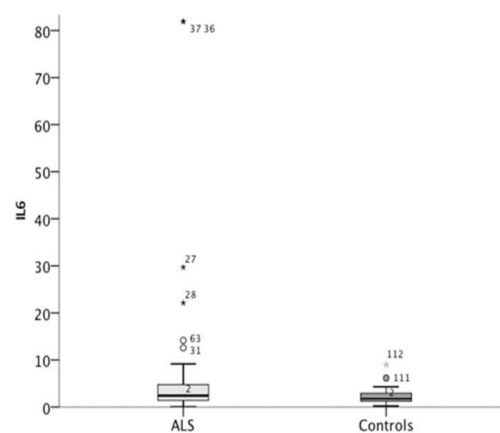


Fig. 1. Comparison between IL-6 levels in controls and ALS patients. We observe a non-significant trend for greater values in ALS population.

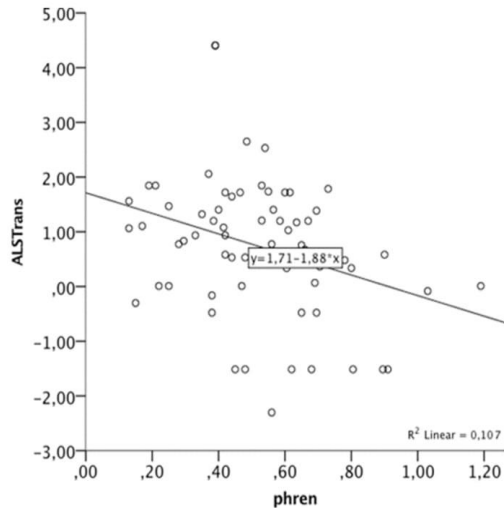


Fig. 2. Correlation between mean bilateral phrenic nerve motor evoked potential (CMAP) and IL-6 levels (the IL-6b values were log-transformed in order to normalize the data for regression analysis). A significant correlation was found.

2.17 pg/ml (SD = 1.58) in the latter group ($p = 0.001$). In the group 16 patients with IL-6 value above the 3rd interquartile (4.45 pg/ml), the time to NIV was shorter than 2 months after sampling in 9 patients, and uncertain in other 2 patients, in the remaining the time interval varied between 4 months (in 2) and 9 months.

4. Discussion

Several inflammatory biomarkers have been found to be elevated in ALS patients, in particular cytokines. This supports the concept that proinflammatory cytokines have a role in the pathogenesis or progression of ALS [15]. A recent meta-analysis has shown that blood tumour necrosis factor- α (TNF), TNF receptor 1, IL-6, interleukin-1 β , IL-8 and vascular endothelial growth factor levels were significantly raised in patients with ALS compared with control subjects [17]. Abnormal numbers of inflammatory cells, and activated astrocytes and microglia have been identified in histological studies of spinal cord and brainstem in ALS [18]. Indeed, PET imaging studies revealed microglial activation in patients with ALS [19].

However, inflammation can have a neuroprotective role through involvement of T-regulatory (Treg)/Th2 immune system, leading to anti-inflammatory neuroprotective responses that block noxious pro-inflammatory mediators [20,21]. The progression rate in ALS seems to be modulated by endogenous Treg activity [22,23]. Elevated cytokine levels can favour either disease progression or neuroprotection depending on a complex interplay between immune cells and their mediators. In particular, IL-6 is a bi-functional cytokine, both performing as a pro-inflammatory mediator [24] and an anti-inflammatory myokine. [25] It has been suggested that increased IL-6 release could represent a neuroprotective reaction against excitotoxic damage [26], as observed in an ALS animal model. [6] IL-6 has a complex action on cell metabolism. It promotes glucose uptake and fatty acid oxidation [27] and increased IL-6 release can induce hypermetabolic imbalance as is associated with ALS [28]. IL-6 metabolism is of current interest as a factor in ALS. This cytokine has recently been proposed as a treatment target, leading to a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled 16-week study evaluating the safety and tolerability of tocilizumab in

subjects with ALS, a study that was completed in July 2018 [29]. We found an increased venous blood level of IL-6 with increasing age, a finding in agreement with Ersler [30], but this finding is not universal [31]. Since there is a diurnal variation in IL-6 levels [32] all our blood samples were taken in the morning, but it is not clear whether this precaution was taken by all other investigators. The levels of IL-6 in our ALS patients were markedly variable (Table 1), and the mean value did not reach statistical significance in our study, as also shown in a meta-analysis by Hu et al. [17]. A further likely related factor is hypoxaemia, and associated pulmonary inflammation. Hypoxemia has been associated to higher IL-6 levels [4,11], probably consequent to hypoxia-activated vascular cells IL-6 induction [33]. In our patients there was a correlation with diaphragmatic CMAP amplitude, suggesting this was important. It would be relevant to have 24 h oxygen saturation studies at the time of blood sampling to definitively address this issue. However, analysing time to NIV initiation as determined by an independent medical team managing respiratory care, our results indicate that higher IL-6 levels were associated with impeding respiratory insufficiency.

In summary the significance of raised IL-6 levels in ALS is currently uncertain. A similar difficulty in understanding potential markers due to respiratory involvement in ALS has been noted, for example, in blood protein CC-16 levels [34].

We conclude that IL-6 should be explored as a marker of respiratory failure in ALS.

Disclosure of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Funding

This work was partially supported by ONWebDuals (JPND-PS/0001/2013), an EU Joint Program - Neurodegenerative Disease Research (JPND) project. The project is supported through the following funding organisations under the aegis of JPND - www.jpnd.eu: Germany, Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF); Poland, Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR); Portugal, Fundação a Ciência e a Tecnologia (FCT); Sweden, Vetenskapsrådet (VR).

References

- [1] C. Brandt, B.K. Pedersen, The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases, *J Biomed Biotechnol* (2010) 520258.
- [2] W.A. Banks, A.J. Kastin, E.G. Gutierrez, Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier, *Neurosci. Lett.* 179 (1994) 53–56.
- [3] T. Sekizawa, H. Openshaw, K. Ohbo, K. Sugamura, Y. Itoyama, J.C. Niland, Cerebrospinal fluid interleukin 6 in amyotrophic lateral sclerosis: immunological parameter and comparison with inflammatory and non-inflammatory central nervous system diseases, *J. Neurol. Sci.* 154 (1998) 194–199.
- [4] C. Moreau, D. Devos, V. Brunaud-Danel, et al., Elevated IL-6 and TNF- α levels in patients with ALS: inflammation or hypoxia? *Neurology* 65 (2005) 1958–1960.
- [5] S.T. Ngo, F.J. Steyn, L. Huang, et al., Altered expression of metabolic proteins and adipokines in patients with amyotrophic lateral sclerosis, *J. Neurol. Sci.* 357 (2015) 22–27.
- [6] C.H. Lu, K. Allen, F. Oei, E. Leoni, et al., Systemic inflammatory response and neuromuscular involvement in amyotrophic lateral sclerosis, *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation* 3 (2016) e24.
- [7] H. Blasco, G. Garçon, F. Patin, et al., Panel of oxidative stress and inflammatory biomarkers in ALS: a pilot study, *Can. J. Neurol. Sci.* 44 (2017) 90–95.
- [8] S. Ono, J. Hu, N. Shimizu, T. Imai, H. Nakagawa, Increased interleukin-6 of skin and serum in amyotrophic lateral sclerosis, *J. Neurol. Sci.* 187 (2001) 27–34.
- [9] M. Tanaka, H. Kikuchi, T. Ishizu, Intrathecal upregulation of granulocyte colony stimulating factor and its neuroprotective actions on motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65 (2006) 816–825.
- [10] J. Ehrhart, A.J. Smith, N. Kuzmin-Nichols, et al., Humoral factors in ALS patients during disease progression, *J. Neuroinflammation* 12 (2015) 127.
- [11] A. Alberti, P. Sarchielli, E. Gallinella, et al., Plasma cytokine levels in patients with sleep obstructive apnea syndrome: a preliminary study, *J. Sleep Res.* 12 (2003)

- 305–311.
- [12] C. Michiels, T. Arnould, J. Remacle, Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions, *Biochim. Biophys. Acta* 1497 (2002) 1–10.
- [13] B.R. Brooks, R.G. Miller, M. Swash, T.L. Munsat, World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases, El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis, *Amyotroph. Lateral Scler.* 1 (2000) 293–299.
- [14] M. De Carvalho, R. Dengler, A. Eisen, et al., Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS, *Clin. Neurophysiol.* 119 (2008) 497–503.
- [15] A. Calvo, C. Moglia, M. Balma, A. Chio, Involvement of the immune response in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis: a therapeutic opportunity? *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 9 (2010) 325–330.
- [16] S. Pinto, A. Turkman, A. Pinto, M. Swash, M. de Carvalho, Predicting respiratory insufficiency in amyotrophic lateral sclerosis: the role of phrenic nerve studies, *Clin. Neurophysiol.* 120 (2009) 491–496.
- [17] Y. Hu, C. Cao, X.Y. Qin, Y. Yu, J. Yuan, Y. Zhao, et al., Increased peripheral blood inflammatory cytokine levels in amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis study, *Sci. Rep.* 7 (2017) 9094.
- [18] M.C. Evans, Y. Couch, N. Sibson, M.R. Turner, Inflammation and neurovascular changes in amyotrophic lateral sclerosis, *Mol. Cell. Neurosci.* 53 (2013) 34–41.
- [19] M.R. Turner, A. Cagnin, F.E. Turkheimer, et al., Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study, *Neurobiol. Dis.* 15 (2004) 601–609.
- [20] I.M. Chiu, A. Chen, Y. Zheng, et al., T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 17913–17918.
- [21] R. Banerjee, R.L. Mosley, A.D. Reynolds, et al., Adaptive immune neuroprotection in G93A-SOD1 amyotrophic lateral sclerosis mice, *PLoS ONE* 3 (2008) e2740.
- [22] D.R. Beers, J.S. Henkel, W. Zhao, et al., Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis, *Brain J. Neurol.* 134 (2011) 1293–1314.
- [23] J.S. Henkel, D.R. Beers, S. Wen, et al., Regulatory T-lymphocytes mediate amyotrophic lateral sclerosis progression and survival, *EMBO Mol. Med.* 5 (2013) 64–79.
- [24] T. Kishimoto, S. Akira, M. Narazaki, T. Taga, Interleukin-6 family of cytokines and gp130, *Blood* 86 (1995) 1243–1254.
- [25] B.K. Pedersen, M.A. Febbraio, Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6, *Physiol. Rev.* 88 (2008) 1379–1406.
- [26] C. Ali, O. Nicole, F. Docagne, et al., Ischemia induced IL-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor mediated excitotoxicity in the brain, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20 (2000) 956–966.
- [27] M.E. Trujillo, S. Sullivan, I. Harten, S.H. Schneider, A.S. Greenberg, S.K. Fried, Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 (2004) 5577–5582.
- [28] L. Dupuis, P.F. Pradat, A.C. Ludolph, J.P. Loeffler, Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis, *Lancet Neurol.* 10 (2011) 75–82.
- [29] NCT02469896: A Trial of Tocilizumab in ALS Subjects (TCZALS-001), Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02469896>.
- [30] W.B. Ershler, Interleukin-6: a cytokine for gerontologists, *J. Am. Geriatr. Soc.* 41 (1993) 176–181.
- [31] M. Maggio, J.M. Guralnik, D.L. Lomago, L. Ferrucci, Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway, *J. Gerontol.* 61 (2006) 575–558.
- [32] A.N. Vgontzas, E.O. Bixler, H.-M. Lin, P. Prolo, G. Trakada, G.P. Chrousos, IL-6 and its circadian secretion in humans, *Neuroimmunomodulation* 12 (2005) 131–140.
- [33] S.F. Yan, I. Tritto, D. Pinsky, et al., Induction of Interleukin (IL-6) by hypoxia in vascular cells, *J. Biol. Chem.* (1995) 11463–11471.
- [34] A. Pronto-Laborinho, M. Gromicho, M. Pereira, S. Pinto, M. do Amparo, M. Swash, et al., Plasma level of Club Cell CC-16 predicts outcome in amyotrophic lateral sclerosis, *Acta Neurol. Scand.* 137 (2017) 233–237.

Escala Funcional ALSFRS-R - The Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale (ALSFRS)

The Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale (ALSFRS)

Measure	Finding	Points
Speech	Normal	4
	Detectable speech disturbance	3
	Intelligible with repeating	2
	Speech combined with nonvocal communications	1
	Loss of useful speech	0
Salivation	Normal	4
	Slight but definite excess of saliva in mouth; may have nighttime drooling	3
	Moderately excessive saliva; may have minimal drooling	2
	Marked excess of saliva with some drooling	1
	Marked drooling; requires constant tissue or handkerchi	0
Swallowing	Normal	4
	Early eating problems; occasional choking	3
	Dietary consistency changes	2
	Needs supplemental tube feedings	1
	Nothing by mouth (NPO); exclusively parenteral or enteral feeding	0
Handwriting	Normal	4
	Slow or sloppy; all words are legible	3
	Not all words are legible	2
	Able to grasp pen but unable to write	1
	Unable to grip pen	0
Cutting food and handling utensils	No gastrostomy/normal	4
	No gastrostomy; somewhat slow and clumsy but no help required	3
	No gastrostomy; can cut most foods although clumsy and slow; some help needed	2
	No gastrostomy; food must be cut by someone but can still feed slowly	1

	No gastrostomy; needs to be bed	0
	With gastrostomy; normal	4
	With gastrostomy; clumsy but able to perform with manipulations independently	3
	With gastrostomy; some help needed with closures and fasteners	2
	With gastrostomy; provides minimal assistance to caregiver	1
	With gastrostomy; unable to perform any aspect of task	0
Dressing and hygiene	Normal	4
	Independent and complete self-care with effort or decreased efficiency	3
	Intermittent assistance or substitute methods	2
	Needs attendant for self-care	1
	Total dependence	0
Turning in bed and adjusting bed clothes	Normal	4
	Somewhat slow and clumsy but no help needed	3
	Can turn alone or adjust sheets but with great difficulty	2
	Can initiate but not turn or adjust sheets alone	1
	Helpless	0
Walking	Normal	4
	Early ambulation difficulties	3
	Walks with assistance	2
	Nonambulatory functional movement only	1
	No purposeful leg movement	0
Climbing stairs	Normal	4
	Slow	3
	Mild unsteadiness or fatigue	2
	Needs assistance	1
	Cannot do	0
Breathing	Normal	4
	Shortness of breath with minimal exertion (walking, talking etc.)	3
	Shortness of breath at rest	2
	Intermittent (e.g. nocturnal) ventilatory assistance required	1
	Ventilator dependent	0

Overview: The Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale (ALSFERS) is an instrument for evaluating the functional status of patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. It can be used to monitor functional change in a patient over time.

Measures: (1) speech (2) salivation (3) swallowing (4) handwriting (5) cutting food and handling utensils (with or without gastrostomy) (6) dressing and hygiene (7) turning in bed and adjusting bed clothes (8) walking (9) climbing stairs (10) breathing

ALSERS = SUM (points for all 10 measures)

Interpretation:

- Minimum score: 0
- Maximum score: 40
- The higher the score the more function is retained.

Performance:

- It shows close agreement with objective measures of muscle strength and pulmonary function.
- It shows good construct validity and is sensitive to change in the patient's condition.
- It shows test-retest reliability and is consistent.

References:

ALS CNTF Treatment Study (ACTS) Phase I-II Study Group. The Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale. Assessment of activities of daily living in patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. Arch Neurol. 1996; 53: 141-147.

Cedarbaum JM Stambler N. Performance of the Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale (ALSFERS) in multicenter clinical trials. J Neurological Sciences. 1997; 152 (Suppl 1): S1 – S9

