



Daniela Filipa Ribeiro Luís

ANÁLISE DO GENE *HTR2A* NA DEGENERESCÊNCIA LOBAR FRONTOTEMPORAL

Tese de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Ciências Biomédicas, orientada pela Professora Doutora Manuela Grazina e co-orientada pela Professora Doutora Isabel Santana, apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Novembro de 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Daniela Filipa Ribeiro Luís

ANÁLISE DO GENE *HTR2A* NA DEGENERESCÊNCIA LOBAR FRONTOTEMPORAL

Tese de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Ciências Biomédicas, orientada pela Professora Doutora Manuela Grazina e co-orientada pela Professora Doutora Isabel Santana, apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Novembro de 2014

Universidade de Coimbra

Copyright © Daniela Luís e Manuela Grazina, 2014.

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e do orientador científico e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada e autorização.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and scientific supervisor and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgment and authorization.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para prestação de provas de Doutoramento em Ciências da Saúde.

O trabalho apresentado nesta tese foi realizado no Laboratório de Bioquímica Genética (LBG), Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC) e Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC), sob a orientação da Professora Doutora Maria Manuela Monteiro Grazina e co-orientação da Professora Doutora Maria Isabel Jacinto Santana, ao abrigo do financiamento concedido pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia - FCT (SFRH/BD/45387/2008).

Agradecimentos

Pelo reconhecimento de que a realização desta dissertação não teria sido possível sem a colaboração, incentivo, interesse e apoio inestimáveis de quem me acompanhou ao longo deste projeto, aqui expresso os devidos agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que esta etapa se tenha tornado realidade.

Em primeiro lugar, um merecido e sentido agradecimento aos meus **pais** e irmãos pela motivação, generosa dedicação, compreensão e por todo o amor e carinho que me deram ao longo deste percurso e em todos os aspetos da minha vida, a que nenhuma palavra de reconhecimento faz jus. Agradeço por me terem ouvido quando tudo parecia tão complicado e impossível de concretizar, durante o qual o precioso e terno apoio que recebi foi determinante para concluir este projeto. Aos meus pais agradeço também a educação que me foi dada e por me terem proporcionado uma excelente formação académica.

Adicionalmente, gostaria de expressar uma gratidão sincera a quem me acompanhou durante o meu percurso a nível científico.

Nesse âmbito, gostaria de agradecer especialmente à Professora Doutora Manuela Grazina, minha orientadora, por me ter proporcionado a realização desta etapa crucial do meu percurso académico. Obrigada pela atenção e incentivo. Agradeço também a partilha de conhecimentos, toda a confiança que depositou em mim, bem como a autonomia concedida que me permitiram crescer cientificamente. Sem o seu apoio teria sido impossível a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Isabel Santana, minha co-orientadora, por generosamente ter aceitado colaborar connosco e coordenado a caracterização clínica dos doentes, aspeto que enriqueceu significativamente este trabalho. Agradeço também o conhecimento clínico que me transmitiu.

Ao Doutor Filipe Silva pela ajuda fundamental que me prestou ao longo deste projeto, por tudo o que me ensinou, pela paciência, preocupação, discussões (“Não me convences...”) e sugestões fundamentais para a prossecução do trabalho.

À Professora Doutora Catarina Resende de Oliveira pela oportunidade de integrar o CNC/UC.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) pelo financiamento e oportunidade que me foi dada.

À Dra Diana Duro a disponibilidade e toda a ajuda prestada na organização dos dados dos doentes.

Aos doentes e seus familiares pela cedência das amostras e dados sem os quais não seria possível a realização deste estudo.

A todos os elementos do Laboratório de Bioquímica Genética do CNC/UC, no Instituto de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pelo auxílio prestado na realização do trabalho experimental. Contudo, ao Dr. João Pratas, à Dra. Marta Simões e à Dra. Cândida Mendes gostaria de fazer um agradecimento especial pela total disponibilidade para me auxiliarem a qualquer momento e por todo o apoio que foram para mim durante este trabalho intensivo. Obrigada pela amizade, companheirismo, por tudo o que me ensinaram, pela preocupação, pelo exemplo de dedicação e competência com que trabalham, por toda a ajuda e paciência que tiveram. Para estes “Aquele abraço!”.

A todos os meus amigos, especialmente à Tânia Sousa, Catarina, Sabrina e à Célia pelo companheirismo, carinho, apoio, incentivo e amizade que contribuíram sem dúvida para a concretização deste trabalho.

Por último, mas indubitavelmente em especial, ao Rúben por estar sempre ao meu lado e pelo apoio incondicional, incentivo, carinho, compreensão e paciência em todos os momentos, especialmente nos mais difíceis que surgiram ao longo desta etapa.

A todos, muito obrigado!

Índice

Índice de figuras	viii
Índice de tabelas	xii
Lista de abreviaturas	xiv
Resumo	xvii
Abstract	xix
1. Introdução	1
1.1. Demência.....	2
1.2. Degenerescência Lobar Frontotemporal	2
1.2.1. Enquadramento histórico	2
1.2.2. Epidemiologia	4
1.2.3. Classificação clínica	5
1.2.4. Classificação neuropatológica.....	10
1.2.5. Genética	14
1.2.6. Intervenção farmacológica	18
1.3. O sistema serotoninérgico	18
1.3.1. Serotonina.....	19
1.3.2. O recetor 5-HTR _{2A}	22
2. Objetivos	25
3. Amostragem e metodologias	27
3.1. Amostragem.....	28
3.1.1. Doentes com diagnóstico provável de Degenerescência Lobar Frontotemporal para análise do gene <i>HTR2A</i>	28
3.1.2. Grupos para a correlação genótipo - fenótipo	28
3.1.3. Grupos para estudo de genómica funcional da variação de sequência rs3125	29
3.2. Metodologias experimentais	30
3.2.1. Análise do gene <i>HTR2A</i> em doentes com diagnóstico provável de Degenerescência Lobar Frontotemporal	30
3.2.1.1. DNA: isolamento e quantificação.....	30
3.2.1.2. Análise da sequência do gene <i>HTR2A</i>	31
3.2.1.3. Confirmação das variações de sequência por PCR-RFLP	35
3.2.2. Correlação genótipo - fenótipo.....	36
3.2.2.1. Genotipagem das variações de sequência.....	36
3.2.2.2. Análise estatística de dados genéticos.....	38
3.2.3. Estudo de genómica funcional da variação de sequência rs3125	39

3.2.3.1. Isolamento das plaquetas e das células mononucleares de sangue periférico.....	39
3.2.3.2. RNA: isolamento e determinação da concentração, qualidade e integridade.....	40
3.2.3.3. Síntese de DNA complementar	41
3.2.3.4. Verificação da presença de DNA genómico	41
3.2.3.5. Identificação das isoformas do gene <i>HTR2A</i> no DNA complementar	42
3.2.3.6. Quantificação relativa de isoformas do gene <i>HTR2A</i> por PCR em tempo real.....	43
3.2.3.6.1. Seleção dos genes de referência	43
3.2.3.6.2. Ensaio experimental	44
3.2.3.6.3. Análise estatística de dados de genómica funcional.....	45
4. Resultados.....	46
4.1. Análise do gene <i>HTR2A</i> em doentes com diagnóstico provável de Degenerescência Lobar Frontotemporal.....	47
4.1.1. Análise da sequência do gene <i>HTR2A</i>	47
4.1.2. Confirmação das variações de sequência por PCR-RFLP	51
4.2. Correlação genótipo - fenótipo	52
4.2.1. Caracterização clínica dos doentes com diagnóstico provável de Degenerescência Lobar Frontotemporal	52
4.2.2. Genotipagem das variações de sequência	54
4.2.3. Análise estatística de dados genéticos	57
4.3. Estudo de genómica funcional da variação de sequência rs3125	63
4.3.1. Determinação da concentração, qualidade e integridade do RNA	63
4.3.2. Verificação da presença de DNA genómico.....	64
4.3.3. Identificação das isoformas do gene <i>HTR2A</i> no DNA complementar	64
4.3.4. Seleção dos genes de referência	66
4.3.5. Quantificação relativa de isoformas do gene <i>HTR2A</i> por PCR em tempo real	66
5. Discussão.....	71
5.1. Análise do gene <i>HTR2A</i> em doentes com diagnóstico provável de Degenerescência Lobar Frontotemporal e correlação genótipo - fenótipo.....	72
5.2. Estudo de genómica funcional da variação de sequência rs3125	77
5.3. Perspetivas futuras.....	85
6. Conclusões.....	86
7. Referências bibliográficas.....	88

Índice de figuras

Capítulo 1

Figura 1.1 Ressonância magnética cerebral de doentes com (A e B) variante comportamental da Demência Frontotemporal, (C) Demência Semântica e (D) Afasia Progressiva Não Fluente (Rabinovici & Miller, 2010).6

Figura 1.2 Subtipos neuropatológicos de DLFT: (A) DLFT-Tau, (B) DLFT-TDP e (C) DLFT-FUS (adaptado de Seltman & Matthews, 2012).13

Figura 1.3 Representação esquemática da biossíntese, neurotransmissão e metabolismo da serotonina (5-HT). O aminoácido L-triptofano é hidroxilado a L-5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase e transformado em 5-HT através da enzima descarboxilase do aminoácido aromático. A despolarização nos terminais dos axónios serotoninérgicos induz o influxo de iões Ca^{2+} e a fusão das vesículas sinápticas que contêm armazenada a 5-HT biossintetizada com a membrana celular. A 5-HT difunde-se no espaço sináptico e interage com os recetores. A 5-HT é recapturada do espaço sináptico pelo transportador de 5-HT (SERT) e armazenada em vesículas. A 5-HT que permanece livre no citoplasma é catabolizada pela monoamina oxidase (MAO) para o metabolito ácido 5-hidroxiindol-acético (5-HIAA) (adaptado de Nichols & Nichols, 2008).21

Figura 1.4 Representação da estrutura da isoforma NP_000621 do recetor 5-HTR_{2A} humano obtida a partir da base de dados “*G Protein - Coupled Receptor*” (Vroling *et al.*, 2011). As cores codificam propriedades dos resíduos (polar, neutra ou carregada; hidrofóbica, aromática ou alifática). Partes da sequência foram deletadas devido à presença de *loops* demasiado longos (representados por “...”). E - *loops* extracelulares, I - *loops* intracelulares, TC - terminal carboxílico, TM - hélices transmembranares e TN - terminal amínico.24

Capítulo 4

Figura 4.1 Representação esquemática da localização das variações de sequência identificadas nos doentes com diagnóstico provável de DLFT em cada isoforma do gene *HTR2A*. Barras azuis mais largas – exões, barras azuis mais estreitas – regiões não traduzidas e barra preta – intrões.48

Figura 4.2 Eletroferograma que permite a identificação da variação de sequência rs3125 em heterozigotia.49

Figura 4.3 A: Eletroferograma correspondente ao fragmento com a deleção rs71790269. Retângulo azul - sequência de nucleótidos sem picos sobrepostos (CTGG) e seta preta - posição adjacente com os nucleótidos C e G sobrepostos. Esquema de cores da leitura dos nucleótidos: A - verde, T - vermelho, C - azul e G - preto. B: Representação em fotografia do eletroferograma obtido em gel de *SeaKem® LE agarose* a 2% correspondente ao fragmento digerido com a *MvaI*. Linhas de migração: 1 - marcador de peso molecular *MassRuler™ DNA Ladder Mix*, 2 - produto da digestão e 3 - controle não digerido.50

Figura 4.4 Representação esquemática das localizações das sequências nucleotídicas correspondentes às bandas 2 (fundo azul) e 3 (fundo lilás). Negrito e sublinhado - *primer reverse* (asterisco na Tabela 3.3), fundo vermelho - *mismatch* no *primer reverse* e retângulos pretos - locais de reconhecimento pela *MvaI*. Localizações genéticas realizadas através do BLAT. A sequência do gene *TSPAN9* foi obtida na base de dados NCBI.51

Figura 4.5 Representação em fotografia dos eletroferogramas obtidos em gel de *SeaKem® LE agarose* a (A) 3%, (B) 2,5%, (C) 3,5%, (D) 2% e (E) 3,5% dos produtos digeridos pelas (A) *Cfr13I*, (B) *MvaI*, (C) *MspI*, (D) *Mva1269I* e (E) *HpyCH4III* para a genotipagem das variações de sequência rs6312, rs1805055, rs6313, rs6314 e rs3125, respectivamente. Linhas de migração - **A:** 1 e 9 marcador de peso molecular *pUC Mix Marker 8*, 2 e 4 genótipo *wild type* AA, 3, 5 e 6 genótipo heterozigótico AG, 7 controlo positivo e 8 controlo não digerido; **B:** 1 e 7 marcador de peso molecular *pUC Mix Marker 8*, 2 e 4 genótipo *wild type* CC, 3 genótipo heterozigótico CA, 5 controlo positivo e 6 controlo não digerido; **C:** 1 e 7 marcador de peso molecular *pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker 23*, 2 e 4 genótipo heterozigótico CT, 3 genótipo *wild type* CC, 5 controlo positivo e 6 controlo não digerido; **D:** 1 e 10 marcador de peso molecular *MassRuler™ DNA Ladder Mix*, 2 e 3 genótipo heterozigótico CT, 4 e 5 genótipo variante TT, 6 e 7 genótipo *wild type* CC, 8 controlo positivo e 9 controlo não digerido; **E:** 1 e 10 marcadores de peso molecular *pUC Mix 8* e *ΦX174/Hinfl 10*, 2 genótipo variante CC, 3, 5 genótipo heterozigótico GC, 4, 6, 7, e 8 genótipo *wild type* GG, 9 controlo positivo e 10 controlo não digerido.52

Figura 4.6 Eletroferograma correspondente à otimização da reação de minissequenciação utilizando uma mistura de amostras com genótipos heterozigóticos para as variações de sequência rs6315, rs6312, rs6310, rs1805055, rs7996679, rs6313, rs6316 e rs6314. Picos laranja - marcador de peso molecular *LIZ-GeneScan™-120 LIZ® Size Standard*. Esquema de cores da leitura dos nucleótidos: A - verde, T - vermelho, C - preto e G - azul.56

Figura 4.7 Representação em fotografia do eletroferograma obtido em gel de <i>Seakem LE agarose</i> a 3% pela digestão com a <i>MspI</i> para a genotipagem da variação de sequência rs6311. Linhas de migração - 1 e 10 marcadores de peso molecular $\Phi X174/HinfI$ 10 e <i>pUC Mix</i> 8, 2 e 3 genótipo heterozigótico GA, 4 genótipo <i>wild type</i> GG, 5 genótipo variante AA, 6 controlo positivo e 7 controlo não digerido.	57
Figura 4.8 Representação gráfica das frequências genótípicas (A e B) e alélicas (C e D) referentes à variação de sequência rs3125 nos subgrupos de mulheres com diagnóstico provável de vcDFT (A e C) e mulheres saudáveis (B e D).	62
Figura 4.9 Representação da atribuição das categorias de integridade e respetivos eletroferogramas correspondentes ao RNA extraído a partir de (A) plaquetas e (B) PBMCs de um indivíduo. FU - unidades de fluorescência e s - segundos.	63
Figura 4.10 Representação em fotografia dos eletroforetogramas obtidos em gel de <i>Seakem LE agarose</i> a 1% para a identificação da presença de DNAg no cDNA sintetizado a partir do RNA extraído das (A) plaquetas e (B) PBMCs. Linhas de migração no gel A e B - 1 marcador de peso molecular <i>Mass Ruler DNA Ladder Mix</i> , 2 cDNA, 3 RT-, 4 controlo negativo da reação de síntese de cDNA, 5 e 6 controlos positivos da PCR e 7 controlo negativo da PCR.	64
Figura 4.11 Representação de uma região dos eletroferogramas identificativos das isoformas (A) NM_000621.4 e (B) NM_001165947.2 do gene <i>HTR2A</i> no cDNA sintetizado a partir do RNA das plaquetas. Reta laranja - <i>exon-exon boundary</i>	65
Figura 4.12 Estabilidade média da expressão dos genes endógenos testados no cDNA das plaquetas atribuída pelo programa <i>geNorm</i>	66
Figura 4.13 Representação gráfica da expressão relativa da isoforma NM_000621.4 do gene <i>HTR2A</i> , em plaquetas, nos (A) grupos totais de mulheres com diagnóstico provável de vcDFT e saudáveis e (B) de acordo com a respetiva expressão alélica da variação de sequência rs3125. Resultados expressos como a média \pm SEM (<i>standard error of the mean</i>). * Valor estaticamente significativo: $p=0,025$	67
Figura 4.14 Representação gráfica da expressão relativa da isoforma NM_001165947.2 do gene <i>HTR2A</i> , em plaquetas, nos (A) grupos totais de mulheres com diagnóstico provável de vcDFT e saudáveis e (B) de acordo com a respetiva expressão alélica da variação de sequência rs3125. Resultados expressos como a média \pm SEM (<i>standard error of the mean</i>).	68

Figura 4.15 Representação gráfica da expressão relativa das duas isoformas do gene *HTR2A*, em plaquetas, nos (A) grupos totais de mulheres com diagnóstico provável de vcDFT e saudáveis e (B) de acordo com os respectivos genótipos para a variação de sequência rs3125. Resultados expressos como a média \pm SEM (*standard error of the mean*).69

Capítulo 5

Figura 5.1 Representação dos miRNAs (miR) que se podem ligar na presença do alelo *wild type* e do variante correspondente à variação de sequência rs3125. Previsão obtida na “*PolymiRTS Database 3.0*”81

Índice de tabelas

Capítulo 3

Tabela 3.1 Distribuição do número de doentes com diagnóstico provável de DLFT e de indivíduos saudáveis por género, idades mínima e máxima, média e desvio-padrão.	29
Tabela 3.2 Distribuição do número de mulheres com diagnóstico provável de vcDFT e saudáveis por idades mínima e máxima, média e desvio-padrão, para o estudo da variação de sequência rs3125.	29
Tabela 3.3 <i>Primers</i> desenhados para a amplificação das regiões alvo no gene <i>HTR2A</i>	32
Tabela 3.4 Enzimas de restrição usadas para a genotipagem de cada variação de sequência e respetivos fragmentos produzidos.	35
Tabela 3.5 Caracterização dos <i>primers</i> desenhados para a reação de minissequenciação.....	37
Tabela 3.6 <i>Primers</i> desenhados para a amplificação por PCR das regiões alvo no cDNA de cada isoforma do gene <i>HTR2A</i>	42
Tabela 3.7 Ensaio usado para a quantificação das isoformas do gene <i>HTR2A</i>	44

Capítulo 4

Tabela 4.1 Variações de sequência identificadas nos doentes com diagnóstico provável de DLFT (n=70), de acordo com as isoformas do gene <i>HTR2A</i> e respetivas frequências genotípicas e alélicas.	47
Tabela 4.2 Distribuição do número de doentes por género, idades mínima, máxima, média, desvio-padrão, idade de início dos sintomas e história familiar de acordo com a variante clínica.....	53
Tabela 4.3 Distribuição do número de doentes pelas características de diagnóstico de depressão, agressividade, MMSE (0 para ausência; 1 para presença, de défice cognitivo) e CDR de acordo com a variante clínica.	53
Tabela 4.4 Resultados de genotipagem das variações de sequência definidas nos doentes com diagnóstico provável de vcDFT e controlos pelas isoformas do gene <i>HTR2A</i> e respetivas frequências genotípicas e alélicas.	55

Tabela 4.5 Resultados da correlação entre os subgrupos de género, idade de início, história familiar, depressão, agressividade, MMSE (*Mini Mental State Examination*: ausência (0) ou presença (1) de défice cognitivo) e CDR (*Clinical Dementia Rating*) dos doentes com diagnóstico provável de vcDFT (n=58) para as variações de sequência rs6311, rs6313 e rs2296973.58

Tabela 4.6 Resultados da correlação entre os subgrupos de género, idade de início, história familiar, depressão, agressividade, MMSE (*Mini Mental State Examination*: ausência (0) ou presença (1) de défice cognitivo) e CDR (*Clinical Dementia Rating*) dos doentes com diagnóstico provável de vcDFT (n=58) para as variações de sequência rs6314 e rs3125.59

Tabela 4.7 Resultados da correlação entre os doentes com diagnóstico provável de vcDFT (D) e os controlos (Ct) para as variações de sequência rs6311 e rs6313.60

Tabela 4.8 Resultados da correlação entre os doentes com diagnóstico provável de vcDFT (D) e controlos (Ct) para as variações de sequência rs6314 e rs3125.61

Tabela 4.9 Análise da variação de sequência rs3125 no DNA genómico (DNAg) e nas isoformas do gene *HTR2A* nas plaquetas de mulheres com diagnóstico provável de vcDFT (1 até 6) e saudáveis (7 até 16).65

Tabela 4.10 Análise da expressão nas PBMCs das isoformas do gene *HTR2A* e de dois genes endógenos (*HPRT1* e *18S*) numa mulher com diagnóstico provável de vcDFT e uma saudável (Ct). .70

Lista de abreviaturas

% v/v	Porcentagem volume por volume
% w/v	Porcentagem massa por volume
χ^2	Teste qui-quadrado
ΔC_T	Diferença entre o C_T do alvo e do controlo endógeno
°C	Grau centígrado
18S	Do inglês <i>eucaryotic 18S ribosomal RNA gene</i>
5' ou 3'UTR	Região não traduzida 5' ou 3' (do inglês 5' or 3' <i>untranslated region</i>)
5-HIAA	5-hidroxiindol-acético (do inglês <i>5-hydroxyindoleacetic acid</i>)
5-HT	5-hidroxitriptamina ou serotonina (do inglês <i>5-hydroxytryptamine</i>)
5-HTP	5-hidroxitriptofano (do inglês <i>5-hydroxytryptophan</i>)
5-HTR_x	Recetores de serotonina do tipo x (x = 1, 1A, 1B, 1D, 1E, 1F, 2, 2A, 2B, 2C, 3, 3A, 3B, 3C, 4, 5, 5A, 5B, 6 e 7)
A	Adenina
ALS	Esclerose lateral amiotrófica (do inglês <i>Amyotrophic Lateral Sclerosis</i>)
APNF	Afasia Progressiva Não Fluente
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
C	Citosina
C9ORF72	Do inglês <i>chromosome 9 open reading frame 72 gene</i>
Ca²⁺	Ião cálcio
cDNA	DNA complementar
CDR	Do inglês <i>Clinical Dementia Rating</i>
CHMP2B	Do inglês <i>charged multivesicular body protein 2B gene</i>
CHMP2B	Do inglês <i>charged multivesicular body protein 2B</i>
cm	Centímetro
CSF	Líquido cefalorraquidiano (do inglês <i>cerebrospinal fluid</i>)
C_T	Do inglês <i>threshold cycle</i>
DA	Demência de Alzheimer
DCB	Degenerescência Corticobasal
ddNTP	2',3'-di-desoxi-ribonucleótido (N= A, T, G, C)
ddNTPs	2',3'-di-desoxi-ribonucleótidos (N= A, T, G, C)
DFT	Demência Frontotemporal
DFT-DNM	Degenerescência Lobar Frontotemporal com características da Doença do Neurónio Motor
DFTP-17	Demência Frontotemporal com Parkinsonismo associada ao cromossoma 17
DLDH	Do inglês <i>Dementia Lacking Distinctive Histopathology</i>
DLFT	Degenerescência Lobar Frontotemporal
DLFT-FUS	DLFT com inclusões de ubiquitina - positiva, TDP-43 - negativa, FUS - positiva
DLFTni	DLFT sem inclusões
DLFT-tau	DLFT com inclusões de tau - positiva
DLFT-TDP	DLFT com inclusões de tau - negativa, ubiquitina e TDP-43 - positivas
DLFT-U	DLFT com inclusões de tau - negativa, ubiquitina - positiva
DLFT-UPS	DLFT com inclusões de ubiquitina - positiva, TDP-43 e FUS - negativas
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)

DNAg	DNA genômico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato (N = A, T, G, C)
DO	Densidade ótica
DP	Desvio-padrão
DS	Demência Semântica
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
EHW	Equilíbrio de Hardy - Weinberg
EOD	Doença de início precoce (do inglês <i>early-onset disease</i>)
ER	Enzima de restrição
ESCRT	Do inglês <i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
F	Feminino
FUS	Do inglês <i>fused in sarcoma gene</i>
FUS	Do inglês <i>fused in sarcoma protein</i>
G	Guanina
GPCRs	Recetores acoplados a proteínas G (do inglês <i>G protein coupled receptors</i>)
GRN	Do inglês <i>progranulin gene</i>
GRN	Do inglês <i>progranulin protein</i>
His	Histidina
HPRT1	Do inglês <i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene</i>
HTR2A	Do inglês <i>5-hydroxytryptamine receptor 2A gene</i>
IBMPFD	DLFT associada à Miopatia do corpo de inclusão e à doença de Paget do osso (do inglês <i>Inclusion Body Myopathy with early - onset Paget Disease and Frontotemporal Dementia</i>)
ins	Inserção
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfato (do inglês <i>inositol 1,4,5-trisphosphate</i>)
Kb	Quilobase
L	Litro
LOD	Doença de início tardio (do inglês <i>late-onset disease</i>)
M	Masculino
MAO	Monoamina oxidase (do inglês <i>monoamine oxidase</i>)
MAPT	Do inglês <i>microtubule associated protein tau gene</i>
Mb	Megabase
mg	Miligrama
Mg²⁺	lão magnésio
miRNA	MicroRNA
miRNAs	MicroRNAs
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMSE	Do inglês <i>Mini Mental State Examination</i>
MVB's	Corpos multivesiculares (do inglês <i>multivesicular bodies</i>)
N	Negativa
n	Número de indivíduos
ng	Nanograma
nm	Nanómetro
NTC	Do inglês <i>no template control</i>
P	Positiva
p	Nível de significância estatística

pb	Pares de bases
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico (do inglês <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Reação da polimerase em cadeia (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
Pg	Picograma
pmol	Picomoles
PRP	Plasma rico em plaquetas
PSP	Paralisia Supra - Nuclear Progressiva
qRT-PCR	PCR em tempo real quantitativo (do inglês <i>quantitative RT-PCR</i>)
RFLP	Polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (do inglês <i>restriction fragment length polymorphism</i>)
RIN	Número de integridade de RNA (do inglês <i>RNA integrity number</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i>)
RNAm	RNA mensageiro
RNAsm	RNAs mensageiros
rpm	Rotações por minuto
RT	Do inglês <i>reverse transcriptase minus</i>
RT-PCR	PCR em tempo real (do inglês <i>real time-PCR</i>)
SAP	Do inglês <i>shrimp alkaline phosphatase</i>
Ser	Serina
SERT	Transportador de 5-HT (do inglês <i>serotonin transporter</i>)
SNC	Sistema nervoso central
SQSTM1	Do inglês <i>sequestosome 1 gene</i>
SSRIs	Inibidores da recaptação serotoninérgica (do inglês <i>Selective Serotonin Reuptake Inhibitors</i>)
T	Timina
TARDBP	Do inglês <i>TAR - DNA binding protein 43 gene</i>
TDP-43	Do inglês <i>TAR DNA binding protein 43</i>
Thr	Treonina
TNF-α	Fator de necrose tumoral - alfa (do inglês <i>tumor necrosis factor - alpha</i>)
TSPAN9	Do inglês <i>tetraspanin-9 gene</i>
Tyr	Tirosina
UV	Radiação ultravioleta
V	Volt
Val	Valina
VcDFT	Variante comportamental da Demência Frontotemporal
VCP	Do inglês <i>valosin - containing protein gene</i>
vs	<i>Versus</i>
xg	Força centrífuga relativa
α	Alfa
β	Beta
μL	Microlitro

Resumo

A demência foi definida como um dos principais desafios do século XXI, devido à sobrecarga que é imposta, não apenas aos cuidadores, mas também aos sistemas social e de saúde. Assim, as demências devem ser o foco, não apenas para o planeamento de cuidados específicos a todos os níveis na sociedade, mas também para a investigação mais aprofundada e eficaz. A Degenerescência Lobar Frontotemporal (DLFT), a segunda causa mais frequente de demência neurodegenerativa precoce, inclui um grupo de doenças heterogêneas que têm em comum a degenerescência seletiva dos lobos frontais e/ou temporais, mas com subtipos clínicos e neuropatológicos distintos. A idade de início varia entre os 45 - 65 anos e a duração entre 6 - 8 anos. Existe uma distribuição semelhante entre os géneros. Atualmente, a DLFT inclui essencialmente três síndromes clínicas: a variante comportamental da Demência Frontotemporal (vcDFT) e duas variantes da linguagem - a Demência Semântica (DS) e a Afasia Progressiva Não Fluente (APNF). Além disso, verifica-se uma sobreposição de sintomas com outras doenças motoras, nomeadamente quando se associa a Doença do Neurónio Motor ou a sinais parkinsonianos: a DFTP-17 (associada a mutações no cromossoma 17), a Degenerescência Corticobasal e a Paralisia Supra - Nuclear Progressiva. A heterogeneidade genética da DLFT evidencia-se pela identificação de mutações nos genes *MAPT*, *GRN*, *VCP*, *CHMP2B*, *TARDBP*, *FUS*, *C9ORF72* e *SQSTM1*. No entanto, desconhece-se ainda o mecanismo subjacente à etiologia da DLFT. Apesar dos poucos estudos existentes, tem sido evidenciada uma disfunção do sistema serotoninérgico (que desempenha um papel importante na modulação comportamental) associada à DLFT. Foi descrita a diminuição significativa do recetor de 5-hidroxitriptamina (serotonina) 2A (5-HTR_{2A}), envolvido em funções cognitivas tais como a memória e a aprendizagem, em áreas cerebrais de doentes com DLFT. Adicionalmente, foi descrita uma associação genética entre as variações de sequência no gene *HTR2A* (gene codificante do 5-HTR_{2A}) e os sintomas psicóticos na Demência de Alzheimer, sendo frequente observar-se uma sobreposição clínica desta patologia com a DLFT.

Desta forma, o objetivo neste trabalho foi averiguar o envolvimento do gene *HTR2A* na patogénese da DLFT.

O gene *HTR2A* foi analisado para a identificação de variações de sequência que pudessem eventualmente estar associadas ao fenótipo clínico de DLFT. Foram incluídos 70 doentes com diagnóstico provável de DLFT, avaliados na Consulta de Demências no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, E.P.E.. O DNA foi extraído a partir de sangue e a análise genética do gene *HTR2A* foi realizada através de amplificação por PCR, usando *primers* específicos, e subsequente

sequenciação de Sanger. Foram identificadas 17 variações de sequência (13 descritas previamente e 4 novas). Os resultados sugerem que as variações de sequência identificadas no gene *HTR2A* não constituem uma causa primária para a etiologia da DLFT.

Posteriormente, variações de sequência identificadas no gene *HTR2A* foram correlacionadas com as características clínicas dos doentes e analisadas num grupo constituído por 92 indivíduos saudáveis (ajustados para etnia, idade e género, sem problemas neurológicos). A genotipagem foi realizada por minissequenciação, sequenciação de Sanger e PCR-RFLP. Na análise estatística foram usados os testes de χ^2 e exato de Fisher (nível de significância quando $p < 0,05$). Os resultados da correlação genótipo - fenótipo sugerem que a variação de sequência rs3125 localizada na região reguladora 3'UTR do gene *HTR2A* constitui um possível fator de risco genético associado ao desenvolvimento de vcDFT nas mulheres (genótipos: $p=0,047$; alelos: $p=0,037$), nomeadamente a perda de heterozigotia e o aumento das frequências do genótipo GG e do alelo G.

Finalmente, a patogenicidade da alteração genética rs3125 foi avaliada através de um estudo de genómica funcional. O RNA foi extraído a partir de plaquetas e células mononucleares do sangue periférico de 6 mulheres com diagnóstico provável de vcDFT e 10 mulheres saudáveis. A expressão alélica da variação de sequência rs3125 foi averiguada em cada isoforma do gene *HTR2A* por sequenciação de Sanger e PCR-RFLP. A expressão das isoformas do gene *HTR2A* foi determinada por PCR em tempo real quantitativo, após a seleção dos genes endógenos mais apropriados. Foi observada uma diminuição estatisticamente significativa da expressão relativa do transcrito NM_000621.4 em plaquetas das mulheres com diagnóstico provável de vcDFT com expressão monoalélica G, comparativamente às saudáveis ($p=0,025$). Este resultado poderá constituir uma possível justificação para a associação obtida do rs3125 como um possível fator de risco para a vcDFT nas mulheres.

Tendo em conta a literatura científica disponível, este estudo forneceu a primeira evidência de que o gene *HTR2A* poderá estar envolvido na suscetibilidade para a vcDFT, sendo, por isso, uma contribuição relevante para o esclarecimento da patogenicidade da DLFT.

Palavras - chave: DLFT, vcDFT, gene *HTR2A* e rs3125.

Abstract

Dementia has already been established as one of the major challenges of the XXIst century, due to the tremendous burden imposed, not only to caregivers, but also on social and health systems. Thus, dementia type disorders should be the focus for, not only specific care planning at all levels in the society, but also for extensive cost - effectiveness research. Frontotemporal lobar degeneration (FTLD), the second most common cause of early - onset neurodegenerative dementia, encompasses a heterogeneous group of diseases that share selective degeneration of frontal and/or temporal lobes, but with different clinical and neuropathological subtypes. The age of onset ranges between 45 - 65 years and the duration of illness is 6 - 8 years. There seems to be an equal distribution between genders. Currently, FTLD includes essentially three clinical syndromes: the behavioral variant of FTD (bvFTD) and two language variants - Semantic Dementia (SD) and Progressive Non - Fluent Aphasia (PNFA). Additionally, there is an overlap of symptoms with other motor disorders, namely when associated with Motor Neuron Disease or parkinsonian signs: DFTP-17 (associated with mutations in chromosome 17), Corticobasal Degeneration and Progressive Supranuclear Palsy. Genetic heterogeneity of FTLD is evident by the identification of mutations in *MAPT*, *GRN*, *VCP*, *CHMP2B*, *TARDP*, *FUS*, *C9ORF72* and *SQSTM1* genes. However, the exact mechanisms underlying FTLD aetiology are still unknown. Despite the limited number of studies, an association between serotonergic system dysfunction (which plays an important role in human behavior modulation) and FTLD has become evident. A significant loss of 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A (5-HTR_{2A}), involved in cognitive functions such as learning and memory, was reported in the brain areas of FTLD patients. Furthermore, genetic association between *HTR2A* gene (5-HTR_{2A} encoding gene) sequence variations and psychotic symptoms was described in Alzheimer's disease, which shares some clinical overlap with FTLD.

Accordingly, the aim of this work was to analyze the involvement of *HTR2A* gene in FTLD pathogenesis.

HTR2A gene was analyzed in order to identify sequence variations that could be associated with FTLD clinical phenotype. We have studied 70 patients with probable diagnosis of FTLD, followed in dementia consultation of "Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra E.P.E.". DNA was extracted from blood and genetic analysis of *HTR2A* gene was performed by PCR amplification, using specific primers, followed by Sanger sequencing. A total of 17 sequence variations (13 previously known and

4 novel unreported) were found. The results suggested that sequence variations identified in *HTR2A* gene seem not to account for FTLD etiology as a primary cause.

Subsequently, sequence variations identified in *HTR2A* gene were correlated with clinical characteristics of patients and analysed in a group of 92 healthy individuals (matched for ethnicity, age and gender, without neurological problems). Genotyping was performed by minisequencing, Sanger sequencing and PCR-RFLP methods. Statistical analysis was performed using χ^2 and Fisher's exact tests (significance was considered when $p < 0.05$). Genotype - phenotype correlation results suggest that rs3125 sequence variation located in 3'UTR regulatory region of *HTR2A* gene is a probable risk factor for the development of bvFTD in females (genotypes: $p = 0.047$; alleles: $p = 0.037$), namely the loss of heterozygosity and the increase of GG genotype and G allele frequencies.

Finally, the pathogenic role of rs3125 genetic alteration was evaluated by a functional genomics study. RNA was extracted from platelets and peripheral blood mononuclear cells isolated from 6 patients with probable diagnosis of bvFTD and 10 healthy individuals, all females. Allelic expression of rs3125 sequence variation was analysed in each isoform of *HTR2A* gene by Sanger sequencing and PCR-RFLP methods. Expression of *HTR2A* gene isoforms was determined by quantitative real-time PCR, after selection of the appropriate endogenous genes. It was observed a statistically significant reduction of NM_000621.4 transcript relative expression in platelets of female patients with probable diagnosis of bvFTD with G monoallelic expression, compared to healthy women ($p = 0.025$). This result could be a possible explanation for the association of rs3125 as a risk factor for bvFTD in females.

Taking into account the literature available, this is the first evidence implicating *HTR2A* gene in susceptibility for bvFTD, being very relevant for the clarity of FTLD pathogenicity.

Keywords: FTLD, bvFTD, *HTR2A* gene and rs3125.

1. Introdução

1.1. Demência

A demência é uma das doenças mais frequentes no idoso e uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos, estando a respetiva frequência a aumentar rapidamente na maioria dos países em consequência do envelhecimento da população (von Strauss *et al.*, 1999; Berr *et al.*, 2005; Santana & Cunha, 2005; Stephan & Brayne, 2008). Ferri *et al.* (2005) estimaram que o número de pessoas dementes irá duplicar a cada 20 anos, passando de 24 milhões em 2001 para 42 e 81 milhões em 2020 e 2040 respetivamente, assumindo que não existem estratégias preventivas eficazes ou tratamentos curativos. A demência, e o aumento no número de casos de demência, impõe encargos económicos e sociais elevados resultantes de custos diretos (assistência médica, medicação e apoios sociais) e indiretos (cuidados não remunerados prestados pela família e amigos) (Wancata *et al.*, 2003; Wimo *et al.*, 2013). De facto, estima-se que o custo mundial em 2010 foi de US\$604 bilhões (Wimo *et al.*, 2013). Perante o exposto, não é surpreendente que a demência tenha sido definida como um dos principais desafios deste século (Berr *et al.*, 2005).

Segundo a 10ª edição da Classificação Internacional das Doenças (CID-10) da Organização Mundial de Saúde a demência é uma síndrome resultante de doença cerebral, em geral de natureza crónica ou progressiva, na qual se registam alterações de múltiplas funções nervosas superiores incluindo a memória, o pensamento, a orientação, a compreensão, o cálculo, a aprendizagem, a linguagem e o raciocínio, na ausência de perturbação do estado de consciência. As perturbações das funções cognitivas são muitas vezes acompanhadas, e eventualmente precedidas, por deterioração do controlo emocional, do comportamento social ou da motivação (World Health Organization, 1992). A doença de Alzheimer (DA), a Degenerescência Lobar Frontotemporal (DLFT), a Demência vascular e a Demência com Corpos de Lewy são as causas de demência mais comuns, afetando sobretudo idosos mas também doentes mais jovens (Rossor *et al.*, 2010; Holmes, 2012).

1.2. Degenerescência Lobar Frontotemporal

1.2.1. Enquadramento histórico

Em 1892, Arnold Pick descreveu o caso de um homem de 71 anos de idade que desenvolvera progressivamente afasia, apatia e demência, tendo o exame patológico revelado uma atrofia cortical proeminente do lobo temporal esquerdo (Pick, 1892). Posteriormente Pick descreveu um outro caso

de um doente de 60 anos com manifestação de negligência, apatia, apraxia e demência, tendo o exame patológico revelado atrofia cortical frontal bilateral (Pick, 1906). Subsequentemente, Alois Alzheimer descreveu as alterações típicas desta doença, designadas como corpos de Pick: “corpúsculos esféricos, argirofílicos e aparentemente sem estrutura definida, localizados na periferia do núcleo das células piramidais do hipocampo” (Alzheimer, 1911). Em 1922, um aluno de Pick, Gans, sugeriu o epónimo de Doença de Pick, correspondendo-lhe a histologia descrita por Alois Alzheimer e propôs que os lobos frontal e temporal, vistos filogeneticamente como mais novos, apresentavam uma vulnerabilidade superior para esta doença degenerativa (Gans, 1922). Nesta década, Onari e Spatz reexaminaram os casos de Pick e outros, enfatizando a histologia associada à atrofia focal (Onari & Spatz, 1926). Como conclusão destes estudos propuseram que perante um quadro clínico de alteração da personalidade acompanhado por uma degenerescência do lobo frontal ou temporal deveria ser proposto o diagnóstico de Doença de Pick mesmo quando os corpos de Pick estavam ausentes na autópsia (Onari & Spatz, 1926; Constantinidis *et al.*, 1974). Surgiu assim uma corrente dicotómica no diagnóstico da Doença de Pick: alguns autores valorizavam essencialmente as características clínicas correspondentes ao processo de atrofia focal dos lobos frontais e temporais, tal como propôs originalmente Pick, enquanto outros o baseavam em critérios histológicos estritos que implicavam a demonstração da presença de corpos de Pick. De acordo com esta última proposta, os patologistas sugeriram tratar-se de uma doença rara e difícil de diagnosticar *in vivo* (Constantinidis *et al.*, 1974). Alguns anos mais tarde, em Lund (Suécia), Gustafson reaprecia clinicamente a doença ao descrever alguns casos que classifica com a designação de Demência Frontotemporal (DFT) (Gustafson, 1987), denominação também adotada por Neary *et al.* (1988), na apresentação da casuística de Manchester. Em 1994, o termo DFT foi adotado por consenso numa conferência que reuniu as equipas de Lund e Manchester, tendo-se proposto a primeira categoria de Critérios de diagnóstico - os denominados critérios de Lund e Manchester que chegariam aos nossos dias (The Lund and Manchester groups, 1994). Desde então, o conhecimento da doença é uma área em constante desenvolvimento, tendo surgido diversas denominações e operacionalizações de classificação. Atualmente, a designação de DLFT é talvez a mais consensual, considerando-se que corresponde a um grupo heterogéneo de doenças que têm em comum a degenerescência seletiva dos lobos frontais e/ou temporais, mas com subtipos clínicos e neuropatológicos distintos (Neary *et al.*, 1998; Mckhann *et al.*, 2001; Mackenzie *et al.*, 2009; Mackenzie *et al.*, 2010; Rascovsky *et al.*, 2011; Schlachetzki, 2011; Seelaar *et al.*, 2011).

1.2.2. Epidemiologia

A DLFT é a segunda causa mais frequente de demência neurodegenerativa precoce (Schlachetzki, 2011; Rohrer, 2012; Seltman & Matthews, 2012). Contudo, a prevalência exata de DLFT permanece incerta devido aos poucos estudos realizados, e à grande dispersão de estimativas produzidas. Os estudos de prevalência no Reino Unido, desenvolvidos independentemente por Ratnavalli *et al.* (2002) e Harvey *et al.* (2003), apontam para valores de 15 e 15,4 por 100000 habitantes respetivamente, para as idades compreendidas entre os 45 - 64 anos. Por sua vez, o estudo realizado por Rosso *et al.* (2003), na Holanda, indica uma prevalência inferior estimando-se 3,6 casos por 100000 habitantes, para as idades compreendidas entre os 50 - 59 anos, 9,4 no intervalo de 60 - 69 e 3,8 entre os 70 - 79 anos. Mais recentemente, Borroni *et al.* (2010) constataram que na população italiana os valores correspondentes de prevalência seriam de 22 entre os 45 - 65 anos, 78 no intervalo de 66 - 75 anos e 54 para doentes com idade superior a 75 anos. Nos Estados Unidos da América estima-se a prevalência entre 15 a 22 casos no intervalo de 45 - 64 anos (Knopman & Roberts, 2011). Em Portugal, não existem estudos de prevalência para esta forma de demência, admitindo-se que possa estar subdiagnosticada (Guimarães *et al.*, 2006). De acordo com o pequeno estudo de Guimarães *et al.* (2006), as DLFT constituiriam 7% de todas as demências diagnosticadas com média de idade de início da doença de 57 ± 9 anos. Contudo, os poucos estudos de incidência existentes têm demonstrado alguma consistência. Na população de Rochester as taxas de incidência foram de 2,2 (por 100000 pessoas), 3,3 e 8,9 para as idades compreendidas entre os 40 - 49 anos, 50 - 59 e 60 - 69 anos, respetivamente (Knopman *et al.*, 2004). Mercy *et al.* (2008) analisaram a incidência no Reino Unido obtendo uma estimativa de 3,5 casos (por 100000 pessoas) no intervalo de 45 - 64 anos. Supõe-se que a incidência da DLFT nos Estados Unidos da América esteja compreendida entre 2,7 e 4,1 casos por 100000 pessoas (Knopman & Roberts, 2011).

A idade de início da DLFT varia entre os 45 a 65 anos (Ratnavalli *et al.*, 2002; Rosso *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2005; Neary *et al.*, 2005; Sleegers *et al.*, 2010; Schlachetzki, 2011; Seelaar *et al.*, 2011; Seltman & Mathews, 2012). No entanto, existem casos definitivos (confirmados histologicamente) de indivíduos em idades extremas, como os 21 e os 85 anos (Snowden *et al.*, 2004; Neary *et al.*, 2005; Schlachetzki, 2011). Knopman & Roberts (2011) estimaram que 10% dos casos de DLFT ocorrem em pessoas com menos de 45 anos, 30% com mais de 65 anos e 60% entre os 45 - 65 anos. Aparentemente existe uma igual distribuição da DLFT entre os géneros (Rosso *et al.*, 2003; Neary *et al.*, 2005; Santana & Cunha, 2005; Pickering-Brown, 2007; Mercy *et al.*, 2008). A duração média da

doença está compreendida entre 6 a 8 anos, podendo variar entre 2 a 20 anos (Neary *et al.*, 2005; Schlachetzki, 2011; Seelaar *et al.*, 2011).

1.2.3. Classificação clínica

Como referimos, em 1994 a nosologia clínica e patológica foi clarificada e o termo DFT adotado numa conferência que reuniu as equipas de Lund e Manchester (The Lund and Manchester groups, 1994). O termo introduzido referia-se à fenomenologia clínica, ou seja, especificamente “a uma síndrome comportamental progressiva invariavelmente associada à atrofia dos lobos frontal e temporal”. De acordo com o mesmo consenso propôs-se que a designação de Doença de Pick ficasse restrita aos casos que histologicamente apresentassem os corpos de Pick. Posteriormente, Neary *et al.* (1998) alargaram e operacionalizaram o espectro clínico de DLFT para incluir três síndromes clínicas: a Demência Frontal, a Afasia Progressiva Não Fluente (APNF) e a Demência Semântica (DS). Em 2001, Mckhann *et al.* publicaram uma revisão/atualização com sugestões para a classificação clinicopatológica da DLFT. Mais recentemente, um consórcio de investigadores internacionais reavaliou os antigos critérios de Lund e Manchester, salientando a sua falta de sensibilidade e especificidade, enfatizando a necessidade de validar e operacionalizar os critérios de diagnóstico para a forma comportamental da DFT (Rascovsky *et al.*, 2007). Como consequência desta corrente, em 2011, Rascovsky *et al.* propuseram critérios revistos para o diagnóstico da variante comportamental da DFT (vcDFT) e Gorno-Tempini *et al.* para as variantes de linguagem. Portanto, atualmente, a DLFT abrange essencialmente três síndromes clínicas: a vcDFT e duas variantes da linguagem - a DS e a APNF, muitas vezes designadas coletivamente por Afasia Progressiva Primária (APP) (Neary *et al.*, 1998; Mckhann *et al.*, 2001; Gorno-Tempini *et al.*, 2011; Rascovsky *et al.*, 2011; Schlachetzki, 2011; Seelar *et al.*, 2011; Seltman & Matthews, 2012). A degenerescência neuronal seletiva e secundariamente o padrão de atrofia cerebral regional, frontal e/ou temporal, esquerdo e/ou direito, determinam a apresentação clínica da doença (Schlachetzki, 2011). A vcDFT está normalmente associada com a disfunção frontal simétrica, enquanto as variantes da linguagem demonstram envolvimento assimétrico do lobo frontal esquerdo (APNF) ou da região temporal anterior deste hemisfério (DS) (Figura 1.1) (Pickering-Brown, 2007; Snowden *et al.*, 2007; Weder *et al.*, 2007; Rabinovici & Miller, 2010; Schlachetzki, 2011; Seelaar *et al.*, 2011).

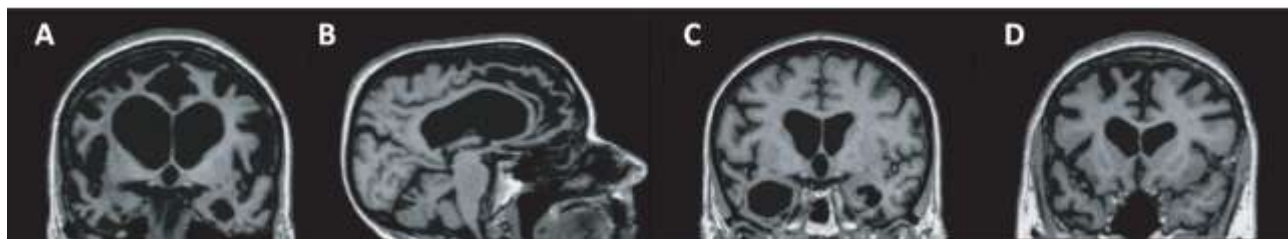


Figura 1.1 Ressonância magnética cerebral de doentes com (A e B) variante comportamental da Demência Frontotemporal, (C) Demência Semântica e (D) Afasia Progressiva Não Fluente (Rabinovici & Miller, 2010).

A **vcDFT** é a síndrome mais comum de DLFT, sendo responsável por metade dos casos (Neary *et al.*, 2005; Kumar-Singh & Van Broeckhoven, 2007; Pickering-Brown, 2007; Snowden *et al.*, 2007; Schlachetzki, 2011; Seelaar *et al.*, 2011; Seltman & Matthews, 2012). A apresentação clínica é semelhante nas formas esporádicas e familiares, e o mesmo se passa relativamente à idade de início precoce ou tardia (Seelaar *et al.*, 2011). A vcDFT é caracterizada pelo início insidioso de alterações na personalidade e do comportamento (Neary *et al.*, 2005; Pickering-Brown, 2007; Snowden *et al.*, 2007; Weder *et al.*, 2007; Slegers *et al.*, 2010; Rascovsky *et al.*, 2011; Schlachetzki, 2011; Seelaar *et al.*, 2011). São frequentes alterações de humor (tais como irritabilidade, depressão, euforia) e o embotamento emocional (Neary *et al.*, 2005; Schlachetzki, 2011; Seelaar *et al.*, 2011). Os doentes sofrem um aplanamento das emoções básicas, tais como tristeza, e das emoções sociais, nomeadamente a simpatia e a empatia (Neary *et al.*, 2005; Schlachetzki, 2011). Além disso, é comum a diminuição no reconhecimento das expressões emocionais, ao nível facial e vocal, e têm dificuldade em inferir o que as outras pessoas sentem ou pensam (Neary *et al.*, 2005). Os comportamentos repetitivos e ritualistas são manifestos, como por exemplo insistir em comer diariamente a mesma comida exatamente à mesma hora, limpar a casa precisamente na mesma ordem (Neary *et al.*, 2005; Kumar-Singh & Van Broeckhoven, 2007; Weder *et al.*, 2007; Slegers *et al.*, 2010; Schlachetzki, 2011; Seelaar *et al.*, 2011). São também frequentes a negligência pela higiene e a mudança nos hábitos alimentares ou hiperoralidade (gula, modismos alimentares, preferência por alimentos doces), com subsequente ganho de peso (Neary *et al.*, 2005; Weder *et al.*, 2007; Schlachetzki, 2011; Seelaar *et al.*, 2011). A vcDFT está associada a alterações cognitivas, sendo mais comuns os défices executivos e da memória do trabalho (Neary *et al.*, 2005; Weder *et al.*, 2007; Rascovsky *et al.*, 2011; Schlachetzki, 2011). Os doentes evidenciam défices no planeamento, julgamento, resolução de problemas, organização, atenção, abstração e flexibilidade mental (Neary *et al.*, 2005; Weder *et al.*, 2007). A

capacidade de memória e as funções primárias de linguagem são mais resistentes à deterioração do que acontece na DA e as habilidades instrumentais primárias, a percepção visual elementar e as capacidades espaciais estão surpreendentemente bem conservadas, mesmo na doença avançada (Neary *et al.*, 2005; Kumar-Singh & Van Broeckhoven, 2007; Schlachetzki, 2011). De facto, os doentes localizam, orientam e alinham os objetos com facilidade (Neary *et al.*, 2005). O discurso é concreto, ecológico e com perseverações e a evolução para mutismo é mais precoce do que se verifica na DA (Neary *et al.*, 2005; Kumar-Singh & Van Broeckhoven, 2007; Weder *et al.*, 2007; Schlachetzki, 2011). Tem sido sugerido que a vcFTD pode ser dividida em três subtipos principais: desinibido (o fenótipo comportamental é caracterizado pela hiperatividade, a desinibição e a desatenção, estando associado a um maior envolvimento das regiões orbito - frontais e do neocórtex temporal anterior), apático (associado à apatia, inércia e perda de iniciativa, sendo a patologia mais difusa no lobo frontal, incluindo as regiões dorsolaterais da convexidade) e estereotipado (mais raro e caracteriza-se pelo comportamento estereotipado e ritualístico, com conformidade excessiva para a rotina e, por vezes, com associação de sintomas motores (acinésia e rigidez), sendo geralmente relacionado com a patologia no *striatum* e no neocórtex) (Snowden *et al.*, 2002; Neary *et al.*, 2005; Pickering-Brown, 2007; Seelaar *et al.*, 2011). Rascovsky *et al.* (2011) propuseram um critério revisto para a classificação clínica da vcDFT em possível, provável ou definitiva. A vcDFT “possível” exige a presença de três das seis características discriminantes: desinibição, apatia/inércia, perda de simpatia/empatia, comportamento perseverativo/estereotipado/compulsivo, hiperoralidade/alterações alimentares e perfil neuropsicológico com défices executivos com preservação relativa da memória e das funções visuoespaciais. A vcDFT “provável” preenche o critério referido para “possível” mais (1) declínio funcional significativo (confirmado pelo cuidador), (2) atrofia frontal e/ou temporal anterior nos estudos de imagem (Tomografia Computadorizada (TAC) ou Ressonância Magnética) ou hipoperfusão ou hipometabolismo frontal e/ou temporal anterior no PET (Tomografia de Emissão de Positrões) ou SPECT (Tomografia de Emissão de Fotões). A vcDFT “definitiva” implica evidência histopatológica de DLFT, por biópsia cerebral ou por estudo *pós-mortem*, ou a identificação de uma mutação patogénica conhecida.

Na **DS** a perturbação observável da linguagem resulta de uma perda da “memória das palavras”, incluindo o seu significado (memória semântica) (Neary *et al.*, 2005; Kumar-Singh & Van Broeckhoven, 2007; Pickering-Brown, 2007; Snowden *et al.*, 2007; Weder *et al.*, 2007; Rabinovici & Miller, 2010; Slegers *et al.*, 2010; Schlachetzki, 2011; Seelaar *et al.*, 2011; Seltman & Matthews, 2012). Na verdade, trata-se de um defeito conceptual mais global, que extravasa o âmbito da

linguagem, como o reconhecimento de objetos, de outros estímulos sensoriais (cheiros, sabores e estímulos táteis) e de faces (Neary *et al.*, 2005; Pickering-Brown, 2007; Snowden *et al.*, 2007; Weder *et al.*, 2007; Rabinovici & Miller, 2010; Slegers *et al.*, 2010; Schlachetzki, 2011; Seltman & Matthews, 2012). Os doentes apresentam um defeito grave da compreensão verbal e o discurso é tipicamente fluente, gramaticalmente e foneticamente correto mas, com anomia, circunlóquios e parafasias semânticas (Kumar-Singh & Van Broeckhoven, 2007; Weder *et al.*, 2007; Rabinovici & Miller, 2010; Slegers *et al.*, 2010; Gorno-Tempini *et al.*, 2011; Schlachetzki, 2011; Seltman & Matthews, 2012). Estes sintomas refletem o envolvimento seletivo das regiões anteriores dos lobos temporais, embora a dominância da patologia no hemisfério esquerdo ou direito influencie a apresentação clínica (Snowden *et al.*, 2007; Gorno-Tempini *et al.*, 2011). Os doentes com as características clínicas típicas da DS apresentam uma atrofia mais acentuada no lobo temporal esquerdo, enquanto os casos com perturbações visuais precoces, particularmente dificuldade no reconhecimento de faces familiares (prosopagnosia) e objetos (agnosia visual), evidenciam uma atrofia mais proeminente no lado direito (Snowden *et al.*, 2007; Gorno-Tempini *et al.*, 2011). Tardamente no desenvolvimento da doença, os doentes tendem a evoluir para mutismo (Kumar-Singh & Van Broeckhoven, 2007).

A **APNF** caracteriza-se pelo declínio na linguagem expressiva com discurso espontâneo não fluente, disártrico ou apráxico, com agramatismo e parafasias fonémicas, na leitura em voz alta e na escrita (Neary *et al.*, 2005; Kumar-Singh & Van Broeckhoven, 2007; Snowden *et al.*, 2007; Weder *et al.*, 2007; Rabinovici & Miller, 2010; Gorno-Tempini *et al.*, 2011; Schlachetzki, 2011). No entanto, a compreensão verbal (oral e escrita) está relativamente bem preservada (Neary *et al.*, 2005; Kumar-Singh & Van Broeckhoven, 2007; Snowden *et al.*, 2007; Weder *et al.*, 2007; Slegers *et al.*, 2010; Schlachetzki, 2011). Existe habitualmente uma evolução para mutismo (Kumar-Singh & Van Broeckhoven, 2007; Schlachetzki, 2011).

Para além destas variantes clássicas (primárias), existe uma sobreposição de sintomas com outras doenças motoras, nomeadamente quando se associa a DNM (DFT-DNM) ou a sinais parkinsónicos: a DFTP-17 (associada a mutações no cromossoma 17), a Degenerescência Corticobasal (DCB) e a Paralisia Supra - Nuclear Progressiva (PSP) (Mckhann *et al.*, 2001; Rabinovici & Miller, 2010; Slegers *et al.*, 2010; Rascovsky *et al.*, 2011; Schlachetzki, 2011; Seelar *et al.*, 2011; Rohrer, 2012; Seltman & Matthews, 2012). A associação de **DNM** pode ocorrer precocemente ou tardiamente em doentes com DLFT (Esmonde, 2002; Rabinovici & Miller, 2010; Seelaar *et al.*, 2011). O fenótipo clínico mais comum é a esclerose lateral amiotrófica (ALS) que associa a degenerescência do primeiro e segundo neurónios motores (Esmonde, 2002; Gitcho *et al.*, 2008). Manifesta-se por sinais piramidais

(primeiro neurónio), atrofia muscular, fraqueza e fasciculações que são mais proeminentes nas extremidades superiores e na língua (Gitcho *et al.*, 2008; Seelaar *et al.*, 2011). A doença tem um desenvolvimento progressivo rápido, apresentando uma sobrevivência média de 3 anos (Hodges *et al.*, 2003; Gitcho *et al.*, 2008; Seelaar *et al.*, 2011). A maioria dos doentes com o fenótipo da DFT-DNM apresenta uma expansão particular, o *repeat* hexanucleotídico GGGGCC no intrão 1 do gene *C9ORF72* (*chromosome 9 open reading frame 72*), no cromossoma 9p13.2 - 21.3 (DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011; Renton *et al.*, 2011). A **DFTP-17** constitui uma forma particular e familiar de demência de transmissão autossómica dominante que resulta de uma mutação. Foi detetada pela primeira vez em 1994, localiza-se no cromossoma 17q21 - 22 e é responsável pela produção anormal e acumulação de uma proteína microtubular, a proteína Tau (Wilhelmsen *et al.*, 1994; Yamaoka *et al.*, 1996; Baker *et al.*, 1997; Basun *et al.*, 1997; Bird *et al.*, 1997; Foster *et al.*, 1997; Froelich *et al.*, 1997; Heutink *et al.*, 1997; Murrell *et al.*, 1997; Spillantini *et al.*, 1997; Hutton *et al.*, 1998; Poorkaj *et al.*, 1998; Spillantini *et al.*, 1998). O fenótipo desta mutação (DFTP-17) caracteriza-se por alterações do comportamento associadas a rigidez (parkinsoniana) e apraxia assimétricas (Kumar-Singh & Van Broeckhoven, 2007; Schlachetzki, 2011). Alguns doentes com DLFT, particularmente casos familiares precoces com mutações nos genes *MAPT* (*microtubule associated protein tau*) ou *GRN* (*progranulin*), podem desenvolver características clínicas semelhantes às dos doentes com a forma esporádica de **DCB** (Josephs, 2007; Kumar-Singh & Van Broeckhoven, 2007; Lladó *et al.*, 2008; Rabinovici & Miller, 2010; Seltman & Matthews, 2012). A síndrome DCB caracteriza-se por uma rigidez assimétrica progressiva e perda sensorial cortical também assimétrica, com apraxia, postura distónica dos membros, *mioclonus* reflexo e o fenómeno de “*alien limb*” (membro que se move involuntariamente ou membro fantasma) (Esmonde, 2002; Santana & Cunha, 2005; Josephs, 2007; Kumar-Singh & Van Broeckhoven, 2007; Lladó *et al.*, 2008; Rabinovici & Miller, 2010; Schlachetzki, 2011; Seltman & Matthews, 2012). O quadro clínico pode ainda incluir afasia progressiva, quando o hemisfério dominante para a linguagem é o mais envolvido, e os doentes tendem a evoluir para um quadro clínico que se assemelha à vcDFT (Kertesz *et al.*, 2005; Josephs, 2007; Kumar-Singh & Van Broeckhoven, 2007; Lladó *et al.*, 2008; Rabinovici & Miller, 2010; Schlachetzki, 2011; Seltman & Matthews, 2012). A DCB esporádica é caracterizada pela acumulação da proteína tau nos neurónios e glia e, portanto, é uma tauopatia (Kumar-Singh & Van Broeckhoven, 2007; Lladó *et al.*, 2008; Schlachetzki, 2011). Nas formas familiares de DLFT, existe igualmente acumulação de tau nos casos com mutação no gene *MAPT*, estando a proteína ausente nas famílias com mutação no gene *GRN* (Tartaglia *et al.*, 2010). A **PSP** (forma esporádica) é uma doença que envolve o sistema extrapiramidal

e o lobo frontal, com manifestações cognitivas e comportamentais comuns à DLFT (Kumar-Singh & Van Broeckhoven, 2007; Josephs, 2007; Rabinovici & Miller, 2010; Seltman & Mathews, 2012). Os fenómenos motores incluem a rigidez axial progressiva, bradicinesia, alteração dos reflexos posturais com quedas frequentes e paralisia dos movimentos verticais do olhar (Esmonde, 2002; Kertesz *et al.*, 2005; Josephs, 2007; Schlachetzki, 2011; Seltman & Mathews, 2012). Na vertente cognitiva salientam-se a diminuição da fluência verbal, ecolália e uma síndrome desexecutivo (Esmonde, 2002; Kertesz *et al.*, 2005; Josephs, 2007; Rabinovici & Miller, 2010; Schlachetzki, 2011; Seltman & Mathews, 2012). A semelhança de sintomas entre a PSP e a DLFT reflete, por um lado o envolvimento das mesmas regiões cerebrais, mas também de uma patologia comum - são ambas doenças pertencentes ao grupo das taupatas (Josephs *et al.*, 2006; Kumar-Singh & Van Broeckhoven, 2007; Mackenzie *et al.*, 2010; Rabinovici & Miller, 2010). Além disso, alguns doentes com formas genéticas de DLFT apresentam um fenótipo com manifestações motoras dominantes, ou seja, com uma clínica enquadrável na síndrome típica da PSP (Goldman *et al.*, 2007; Rabinovici & Miller, 2010).

1.2.4. Classificação neuropatológica

As alterações neuropatológicas descritas por Pick em 1892 e pelos seus seguidores criaram uma grande controvérsia, como foi referido em cima. Na verdade, muitos dos doentes com quadros clínicos sugestivos desta forma de demência não apresentavam as características inclusões de proteína tau (corpos de Pick). Esta foi uma das questões discutida durante a conferência de consenso entre as equipas de Lund e Manchester em 1994 (The Lund and Manchester groups, 1994). Como resultado desta conferência propuseram-se as primeiras categorias de critérios neuropatológicos para a DLFT (The Lund and Manchester groups, 1994). Estudos posteriores revelaram que 50% dos casos clinicamente definidos como DLFT eram familiares, muitos deles tinham depósitos insolúveis da proteína tau e estavam associados ao cromossomo 17 (Baker *et al.*, 1997; Murrell *et al.*, 1997; Spillantini *et al.*, 1997). Os referidos casos, inicialmente descritos como “*familial multiple system tauopathy with dementia*”, foram classificados por DFTP-17 (Foster *et al.*, 1997) e em 1998 verificou-se que estavam efetivamente associados a mutações no gene *MAPT* (Hutton *et al.*, 1998; Poorkaj *et al.*, 1998; Spillantini *et al.*, 1998). Em 1992, Wightman *et al.* identificaram inclusões de ubiquitina no hipocampo e neocórtex de doentes com ALS e demência, e os mesmos depósitos foram igualmente detetadas posteriormente em casos de DLFT definidos patologicamente sem ALS (Cooper *et al.*, 1995; Jackson & Lowe, 1996; Woulfe *et al.*, 2001). Por conseguinte, em 2001, o “*Work Group on*

Frontotemporal Dementia and Pick's Disease" (McKhann *et al.*, 2001; Trojanowski & Dickson, 2001) reavaliou os critérios neuropatológicos recomendando a classificação em dois tipos patológicos principais: DLFT com patologia tau - positiva (DLFT-tau) e DLFT tau - negativa, ubiquitina - positiva (DLFT-U). Os casos com inclusões negativas para a tau ou ubiquitina eram classificados como "*Dementia Lacking Distinctive Histopathology*" (DLDH). Em 2006, as autópsias realizadas ao cérebro de doentes com DLFT e ALS possibilitaram a identificação do principal elemento das inclusões ubiquitinadas, a proteína TDP-43 (Arai *et al.*, 2006; Neumann *et al.*, 2006). Nos neurónios afetados a TDP-43 localizava-se no citoplasma na forma hiperfosforilada, ubiquitinada e clivada, originadora de fragmentos com o terminal carboxílico, enquanto nos intatos observava-se uma distribuição predominantemente nuclear (Arai *et al.*, 2006; Neumann *et al.*, 2006). Posteriormente verificou-se que a maioria dos casos classificados como DLDH, anteriormente pensado ser o subtipo patológico mais comum, correspondia, na verdade, à DLFT-U, apresentando também depósitos de TDP-43 (Lipton *et al.*, 2004; Josephs *et al.*, 2004a; Josephs *et al.*, 2004b; Shi *et al.*, 2005; Mackenzie *et al.*, 2006; Kumar-Singh & Van Broeckhoven, 2007). Em consequência, vários autores propõem mais uma revisão dos critérios neuropatológicos e a proposta de uma nova classificação (Cairns *et al.*, 2007). Porém, embora a identificação da TDP-43 tenha suscitado a ideia que correspondia à proteína patológica presente nos casos de DLFT-U (Arai *et al.*, 2006; Neumann *et al.*, 2006; Davidson *et al.*, 2007), estudos subsequentes identificaram exceções, sugerindo o envolvimento de outras proteínas e novas propostas de classificação (Cairns *et al.*, 2007; Holm *et al.*, 2007; Mackenzie *et al.*, 2007; Josephs *et al.*, 2008; Mackenzie *et al.*, 2008; Pikkarainen *et al.*, 2008; Roeber *et al.*, 2008; Mackenzie *et al.*, 2009). Efetivamente em 2009, Kwiatkowski *et al.* e Vance *et al.* identificaram mutações no gene *FUS* (*fused in sarcoma*) associadas à ALS e inclusões da proteína FUS no citoplasma dos neurónios dos portadores. Neumann *et al.* (2009) viriam a confirmar que alguns dos casos de DLFT, que apresentavam inclusões de ubiquitina negativas para a tau e TDP-43, eram positivas para a FUS, apesar de não identificarem mutações no gene *FUS*. Estudos posteriores confirmaram a existência do subtipo patológico DLFT-FUS (Seelaar *et al.*, 2010, Urwin *et al.*, 2010), conduzindo a um *update* (Mackenzie *et al.*, 2010) da nomenclatura proposta por Mackenzie *et al.* (2009). Atualmente a DLFT é dividida nos subtipos: DLFT com inclusões de tau - positiva (DLFT-tau); DLFT com inclusões de tau - negativa, ubiquitina e TDP-43 - positivas (DLFT-TDP); DLFT com inclusões de ubiquitina - positiva, TDP-43 - negativa, FUS - positiva (DLFT-FUS); DLFT com inclusões de ubiquitina - positiva, TDP-43 e FUS - negativas (DLFT-UPS) e DLFT sem inclusões (DLFTni) (Mackenzie *et al.*, 2010).

O subtipo **DLFT-Tau** inclui neurites, inclusões citoplasmáticas neuronais e glias imunorreativas para a proteína tau hiperfosforilada associada a microtúbulos, bem como os casos com mutações no gene *MAPT* (Figura 1.2A) (Murrell *et al.*, 1997; Spillantini *et al.*, 1997; Hutton *et al.*, 1998; Poorkaj *et al.*, 1998; Spillantini *et al.*, 1998; McKhann *et al.*, 2001; Reed *et al.*, 2001; Cairns *et al.*, 2007; Mackenzie *et al.*, 2009; Mackenzie *et al.*, 2010).

O subtipo **DLFT-TDP** caracteriza-se pela presença de neurites distróficas, inclusões citoplasmáticas e intranucleares neuronais e citoplasmáticas glias imunorreativas para a TDP-43 nas camadas superficiais do neocórtex frontal, temporal e no hipocampo (Figura 1.2B) (Arai *et al.*, 2006; Neumann *et al.*, 2006; Cairns *et al.*, 2007; Hasegawa *et al.*, 2008; Igaz *et al.*, 2008; Mackenzie *et al.*, 2009; Mackenzie *et al.*, 2010). A proteína TDP-43 é hiperfosforilada, ubiquitinada e fragmentada no terminal carboxílico (Neumann *et al.*, 2006; Hasegawa *et al.*, 2008; Igaz *et al.*, 2008). Em termos genéticos é o subtipo mais pleomórfico, tendo-se identificado indivíduos portadores de mutações nos genes *GRN*, *VCP* (*valosin - containing protein*), *TARDBP* (*TAR - DNA binding protein 43*) e recentemente no *C9ORF72* (Mackenzie *et al.*, 2010). O subtipo DLFT-TDP pode ser classificado em quatro grupos histológicos de acordo com a localização subcelular e proporção: o tipo A inclui principalmente casos com a vcDFT e APNF e os portadores de mutações no gene *GRN*, a TDP-43 está expressa em numerosas inclusões citoplasmáticas neuronais e neurites distróficas, em número variável em inclusões intranucleares neuronais, predominantemente na camada cortical 2; o tipo B está associado com a vcDFT e a DFT-DNM, a TDP-43 está localizada principalmente em inclusões citoplasmáticas neuronais em todas as camadas corticais, mas muito poucas neurites distróficas; o tipo C inclui sobretudo casos de DS e vcDFT, a TDP-43 está expressa em numerosas neurites distróficas alongadas nas camadas corticais superiores e em muito poucas inclusões citoplasmáticas neuronais; o tipo D é característico dos portadores de mutações no gene *VCP*, a TDP-43 é identificada em numerosas inclusões intranucleares neuronais e neurites distróficas, poucas inclusões citoplasmáticas neuronais e em todas as camadas (Mackenzie *et al.*, 2011).

No subtipo **DLFT-FUS** observam-se neurites distróficas, inclusões citoplasmáticas e intranucleares neuronais e citoplasmáticas glias negativas para a TDP-43 e imunorreativas para a ubiquitina e proteína FUS no córtex frontal, temporal e hipocampo (Figura 1.2C) (Neumann *et al.*, 2009; Mackenzie *et al.*, 2010; Seelaar *et al.*, 2010; Urwin *et al.*, 2010). A ALS com patologia FUS é quase sempre causada por uma mutação no gene *FUS*, contudo não foi identificada nenhuma nos casos analisados de DLFT-FUS (Kwiatkowski *et al.*, 2009; Neumann *et al.*, 2009; Vance *et al.*, 2009; Urwin *et al.*, 2010). Neumann *et al.* (2011) verificaram que a acumulação das proteínas FUS, EWS

(*Ewing's Sarcoma*) e TAF15 (*TATA - Binding Protein - Associated Factor 15*) nas inclusões patológicas FUS, constituintes da família FET e supondo-se que interagem entre si formando complexos (Law *et al.*, 2006; Kovar, 2011), foi uma característica consistente. Embora os respectivos papéis não estejam elucidados, propuseram a substituição da designação do subtipo DLFT-FUS para DLFT-FET.

No subtipo **DLFT-UPS** os doentes têm inclusões citoplasmáticas neuronais imunorreativas para as proteínas do *Ubiquitin Proteasome System* (UPS), tais como a ubiquitina e a p62, mas negativas para a tau, TDP-43 e FUS, nos lobos frontais, temporais e no hipocampo (Mackenzie *et al.*, 2010; Urwin *et al.*, 2010). Alguns doentes apresentam mutações no gene *CHMP2B* (*charged multivesicular body protein 2B*), noutras não foi identificada nenhuma (Mackenzie *et al.*, 2010).

Finalmente o sub-grupo **DLFT-ni** (anteriormente designado por DLDH) inclui uma minoria dos casos que não apresentam inclusões de tau, ubiquitinadas, de TDP-43 ou FUS, mesmo recorrendo às técnicas modernas de imunohistoquímica (Mackenzie *et al.*, 2010; Urwin *et al.*, 2010).



Figura 1.2 Subtipos neuropatológicos de DLFT: (A) DLFT-Tau, (B) DLFT-TDP e (C) DLFT-FUS (adaptado de Seltman & Matthews, 2012).

Na categoria de diagnóstico clínico definitivo de DLFT exige-se a combinação de um quadro clínico típico com a observação de alterações histopatológicas compatíveis com um dos subgrupos/tipo referidas ou a identificação de uma mutação patogénica para a DLFT (Rascovsky *et al.*, 2011). Até ao momento, não foi determinada nenhuma relação definitiva entre o subtipo neuropatológico e o fenótipo clínico na DLFT (Cairns *et al.*, 2007; Seltman & Matthews, 2012). Portanto, não há uma correlação consistente entre a vcDFT, DS e a APNF com neuropatologias subjacentes específicas, bem como a presença de uma determinada neuropatologia não possibilita prever com confiança o fenótipo clínico de DLFT (Cairns *et al.*, 2007). Contudo, Josephs *et al.* (2011)

sugeriram a existência de uma associação entre a histopatologia do subtipo DLFT-TDP com a DFT-DNM e DS, e do DLFT-Tau com a PSP e DCB. Rohrer *et al.* (2011) observaram que a DS e a DFT-DNM estavam predominantemente associadas com a histopatologia DLFT-TDP, mais especificamente do tipo C e B respectivamente, e a vcDFT de início precoce com a DLFT-FUS. A histopatologia subjacente à vcDFT típica era heterogénea, não evidenciando nenhuma associação clara com um subtipo.

1.2.5. Genética

A DLFT é uma patologia com elevada hereditariedade, existindo no entanto grandes variações em termos de agregação familiar entre as síndromes clínicas que incorpora. De facto, enquanto nos casos de vcDFT 30 - 50% apresentam uma história familiar positiva, a frequência é muito inferior nas variantes DS e APNF (Chow *et al.*, 1999; Goldman *et al.*, 2005; Rohrer *et al.*, 2009; Schlachetzki, 2011; Seelaar *et al.*, 2011). Por outro lado, a percentagem dos casos que manifestam hereditariedade autossómica dominante é consideravelmente menor, variando na literatura entre 10 a 27% (Chow *et al.*, 1999; Rosso *et al.*, 2003; Goldman *et al.*, 2005; Seelaar *et al.*, 2008; Rohrer *et al.*, 2009; See *et al.*, 2010; Schlachetzki, 2011; Seelaar *et al.*, 2011; Galimberti & Scarpini, 2012). Existe uma grande heterogeneidade genética na DLFT, tendo sido identificadas mutações nos genes *MAPT*, *GRN*, *VCP*, *CHMP2B*, *TARDBP*, *FUS*, *C9ORF72* e *SQSTM1*.

Desde a associação do gene ***MAPT*** com a DFT-17 (Hutton *et al.*, 1998; Poorkaj *et al.*, 1998; Spillantini *et al.*, 1998), foram identificadas mais de 40 mutações nesse gene: mutações *missense* nos exões 9 - 13 que modificam a sequência proteica, alterando a interação da proteína tau com os microtúbulos (mutações), e mutações intrónicas e na região codificante que influenciam o *splicing* do exão 10 no RNA mensageiro (RNAm), resultando na alteração da razão das isoformas tau 3R (3 domínios de ligação) e 4R (4 domínios de ligação) (Goedert *et al.*, 2004; Brandt *et al.*, 2005; See *et al.*, 2010; Schlachetzki, 2011; Seelaar *et al.*, 2011; Cruts *et al.*, 2012; Galimberti & Scarpini, 2012). As mutações no gene *MAPT* foram associadas às síndromes clínicas de vcDFT, DS, APNF, PSP, DCB e ALS, apresentam elevada penetrância e conduzem à idade de início da doença entre os 40 a 60 anos (média de 55 anos) (Goldman *et al.*, 2007; Rabinovici & Miller, 2010; See *et al.*, 2010; Galimberti & Scarpini, 2012; Seltman & Mathews, 2012).

Na década de 90, foram identificadas várias famílias com *linkage* para a mesma região cromossómica do gene *MAPT*, 17q21, mas sem mutações e com inclusões intraneuronais negativas para a tau, mas positivas para a proteína ubiquitina (Bird *et al.*, 1997; Froelich *et al.*, 1997; Lendon *et*

al., 1998; Kertesz *et al.*, 2000; Rosso *et al.*, 2001; Curcio *et al.*, 2002; Rademakers *et al.*, 2002; Froelich Fabre *et al.*, 2003; Cruts *et al.*, 2005; Gass *et al.*, 2006; Mackenzie *et al.*, 2006; van der Zee *et al.*, 2006). Em 2006, foram finalmente identificadas mutações no gene **GRN** localizado a 1,7Mb *upstream* do *MAPT* (Bhandari & Bateman, 1992; Baker *et al.*, 2006; Cruts *et al.*, 2006). Até ao momento, foram descritas mais de 70 mutações, incluindo *nonsense*, *frameshift*, *missense*, no *splice site*, que promovem na sua maioria a redução da progranulina funcional devido ao mecanismo *non - sense - mediated decay* (NMD), conduzindo à haploinsuficiência (Baker *et al.*, 2006; Boeve *et al.*, 2006; Cruts *et al.*, 2006; Gass *et al.*, 2006; Mukherjee *et al.*, 2006; Pickering-Brown *et al.*, 2006; Le Ber *et al.*, 2007; Gijssels *et al.*, 2008; Le Ber *et al.*, 2008; Mukherjee *et al.*, 2008; Rovelet-Lecrux *et al.*, 2008; Cruts *et al.*, 2012; Galimberti & Scarpini, 2012). As mutações no gene *GRN* estão associadas à idade de início dos sintomas entre os 35 a 89 anos (média de 60 anos), apresentam penetrância variável (estimada como sendo correspondente a 50% e 90% aos 60 e 70 anos, respetivamente) e a diversas variantes clínicas: *vcDFT*, *DCB*, *APNF* e raramente na *DNM* (Goldman *et al.*, 2007; Rabinovici & Miller, 2010; See *et al.*, 2010; Schlachetzki, 2011; Seelaar *et al.*, 2011; Galimberti & Scarpini, 2012; Seltman & Mathews, 2012).

Em 1995, foi identificado um *linkage* com uma região no cromossoma 3 numa família dinamarquesa com *DLFT* (Brown *et al.*, 1995). Posteriormente, Skibinski *et al.* (2005) e Lindquist *et al.* (2008) identificaram na família mutações no gene **CHMP2B** (localizado no cromossoma 3p11.2). O gene *CHMP2B* codifica um componente do complexo heterotrimérico ESCRTIII (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport III*) que é recrutado, juntamente com os complexos ESCRTI e ESCRTII, do citoplasma para a membrana endossomal para funcionarem sequencialmente na transferência das proteínas transmembranares para a via dos corpos multivesiculares (MVB's) e na formação dos MVB's (Babst *et al.*, 2002; Babst, 2005). Até ao momento, foram descritas poucas mutações adicionais em doentes com *DLFT*, incluindo *nonsense* e *missense* (Momeni *et al.*, 2006; Parkinson *et al.*, 2006; van der Zee *et al.*, 2008; Ferrari *et al.*, 2010; Cruts *et al.*, 2012). Vários estudos em doentes com *DLFT* não detetaram mutações, sugerindo constituir uma causa rara para esta patologia (Cannon *et al.*, 2006; Rizzu *et al.*, 2006; Schlachetzki, 2011; Galimberti & Scarpini, 2012). Embora seja desconhecido de que modo as mutações detetadas no gene *CHMP2B* conduzem a neurodegenerescência, estudos de sobre - expressão das proteínas mutantes em células em cultura revelaram a formação de estruturas endossomais aberrantes (Skibinski *et al.*, 2005; Van der Zee *et al.*, 2008). Filimonenko *et al.* (2007) observaram que a degradação autofágica é inibida em células deletadas das subunidades do ESCRT ou que expressam as proteínas *CHMP2B* mutantes,

promovendo a acumulação de agregados positivos para a ubiquitina e p62. As mesmas inclusões são identificadas nos indivíduos com mutações no gene *CHMP2B* (Holm *et al.*, 2007; Mackenzie *et al.*, 2010; Urwin *et al.*, 2010).

Kovach *et al.* (2001) demonstraram uma associação da IBMPFD, uma patologia autossômica dominante rara caracterizada por uma penetrância variável da tríade de características clínicas DLFT, Miopatia do Corpo de Inclusão (IBM) e Doença de Paget do Osso (PDB) (Kimonis & Watts, 2005; Kimonis *et al.*, 2008), com uma região no cromossoma 9p13.3 - 12. Em 2004, Watts *et al.* analisaram 13 famílias diagnosticadas com IBMPFD e identificaram seis mutações *missense* (p.Arg95Gly, p.Arg155His, p.Arg155Cys, p.Arg155Pro, p.Arg191Gln e p.Ala232Glu) no gene *VCP*. Este gene codifica a proteína contendo valosina de 97KDa (Pleasure *et al.*, 1993), um membro da superfamília AAA-ATPase do tipo II envolvida em vários processos celulares (Kondo *et al.*, 1997; Rabouille *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 2000; Dai & Li, 2001; Hetzer *et al.*, 2001; Rabinovich *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004a). Até ao momento, foram descritas poucas mutações adicionais (Haubenberger *et al.*, 2005; Guyant-Maréchal *et al.*, 2006; Bersano *et al.*, 2009; Djamshidian *et al.*, 2009; Cruts *et al.*, 2012). Os estudos neuropatológicos nos doentes com mutações no gene *VCP* revelaram a presença de inclusões neuronais intranucleares positivas para a ubiquitina (Schröder *et al.*, 2005; Guyant-Maréchal *et al.*, 2006; Watts *et al.*, 2007; Bersano *et al.*, 2009; Djamshidian *et al.*, 2009). Posteriormente, Neumann *et al.* (2007) detetaram a acumulação da proteína TDP-43 com a ubiquitina nos doentes com IBMPFD. Estudos de células em cultura e modelos animais sustentam a hipótese das mutações no gene *VCP* promoverem a transferência da TDP-43 do núcleo para o citosol, diminuírem a atividade do proteassoma, induzirem *stress* no retículo endoplasmático, comprometendo a viabilidade celular (Weihl *et al.*, 2006; Gitcho *et al.*, 2009a).

O gene *TARDBP*, localizado no cromossoma 1p36.22, codifica a proteína TDP-43 (Wang *et al.*, 2004b). O papel patogénico da TDP-43 na neurodegenerescência ficou evidente em 2006 pela identificação da sua presença nas inclusões ubiquitinadas no cérebro de doentes com DLFT e ALS (Arai *et al.*, 2006; Neumann *et al.*, 2006). Posteriormente, foram identificadas mutações no gene *TARDBP* em indivíduos com a ALS esporádica e familiar (Gitcho *et al.*, 2008; Kabashi *et al.*, 2008; Rutherford *et al.*, 2008; Sreedharan *et al.*, 2008; Van Deerlin *et al.*, 2008). Até ao momento, foram descritas poucas mutações na DLFT, incluindo *missense* e na região não traduzida 3' (3'UTR) (Benajiba *et al.*, 2009; Borroni *et al.*, 2009; Gitcho *et al.*, 2009b; Kovacs *et al.* 2009; Borghero *et al.*, 2011; Cruts *et al.*, 2012). Estudos sugerem a hipótese das mutações no gene *TARDBP* conduzirem a

anormalidades no neurónio motor, ao ganho de toxicidade, à perda da função da TDP-43 concomitante com a propensão aumentada para a sua agregação (Kabashi *et al.*, 2010).

O gene **FUS**, localizado 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 (Croizat *et al.*, 1993; Aman *et al.*, 1996; Zinszner *et al.*, 1997; Perrotti *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998; Baechtold *et al.*, 1999; Bertrand *et al.*, 1999; Law *et al.*, 2006; Kovar, 2011). O papel patogénico da FUS na neurodegenerescência ficou evidente pela sua identificação em inclusões no citoplasma dos neurónios dos indivíduos com ALS e portadores de mutações no gene *FUS* (Kwiatkowski *et al.*, 2009; Vance *et al.*, 2009), bem como em alguns casos de DLFT que apresentavam inclusões tau e TDP-43 negativas (Neumann *et al.*, 2009; Seelaar *et al.*, 2010; Urwin *et al.*, 2010). Em 2010, foram identificadas as mutações p.Met254Val, p.Gly206Ser e p.Gly174-Gly175del no gene *FUS* na DLFT (Van Langenhove *et al.*, 2010; Yan *et al.* 2010). O estudo desenvolvido por Huang *et al.* (2011), usando ratos transgénicos que expressaram o gene *FUS* com e sem a mutação p.Arg521Cys, sugeriu que a expressão da FUS mutante promove o desenvolvimento de fenótipos consistentes com ALS e DLFT. Além disso, verificaram que a expressão aumentada da FUS normal é suficiente para causar morte neuronal, sendo a mutante ainda mais tóxica para os neurónios. Contudo, ainda permanece incerto de que modo as mutações no gene *FUS* contribuem para o desenvolvimento de DLFT.

Diversos estudos identificaram um *linkage* ao *locus* cromossómico 9p13.2 - 21.3 em várias famílias autossómicas dominantes diagnosticadas com DLFT, DFT-DNM, DFT-ALS e ALS (Morita *et al.*, 2006; Vance *et al.*, 2006; Valdmanis *et al.*, 2007; Luty *et al.*, 2008; Le Ber *et al.*, 2009; van Es *et al.*, 2009; Gijssels *et al.*, 2010; Laaksovirta *et al.*, 2010; Shatunov *et al.*, 2010). Na análise neuropatológica os doentes demonstravam proteinopatia TDP-43 (Cairns *et al.*, 2007; Mackenzie *et al.*, 2011). Em 2011, o *repeat* hexanucleotídico GGGGCC no intrão 1 do gene **C9ORF72** foi identificado como sendo a causa da DFT-ALS associada ao cromossoma 9p13.2 - 21.3 (DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011; Renton *et al.*, 2011). Tem sido sugerido que a expansão do *repeat* pode implicar mecanismos de alteração da função pela influência ao nível da transcrição (perda de um transcrito produzido por *splicing* alternativo) ou causando a formação de RNA *foci* nuclear (DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011; Renton *et al.*, 2011; Gijssels *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2013).

Mutações no gene **SQSTM1** (*sequestosome 1*), localizado no cromossoma 5q35 e codificante da proteína p62, foram identificadas como a causa da PDB (Laurin *et al.*, 2002; Gennari *et al.*, 2010). Posteriormente, Fecto *et al.* (2011) detetaram mutações em doentes com ALS e Rubino *et al.* (2012)

em 3 sujeitos com DLFT. A associação entre o *SQSTM1* e a DLFT foi posteriormente confirmada por Le Ber *et al.* (2013). Contudo, são necessários estudos funcionais para averiguar o papel que as mutações desempenham na patogênese da DLFT. A p62 é uma proteína multifuncional implicada em várias atividades celulares, mencionando-se por exemplo a sua participação na marcação das proteínas ubiquitinadas para degradação, por autofagia ou pelas vias proteossomais, e nos mecanismos de transdução de sinal (Rubino *et al.*, 2012; Le Ber *et al.*, 2013).

1.2.6. Intervenção farmacológica

Não há terapia preventiva, curativa e de estabilização para a DLFT. As estratégias farmacológicas têm-se focalizado na modulação e substituição de neurotransmissores para o tratamento dos sintomas comportamentais, motores e cognitivos, incluindo inibidores da recaptção serotoninérgica (SSRIs), inibidores de acetilcolinesterase, antipsicóticos atípicos e antagonistas do recetor de glutamato NMDA, sendo a sua utilização limitada devido aos perfis de efeitos adversos (Swartz *et al.*, 1997; Lebert & Pasquier, 1999; Moretti *et al.*, 2003; Ikeda *et al.*, 2004; Moretti *et al.*, 2004; Mendez *et al.*, 2007; Weder *et al.*, 2007; Kertesz *et al.*, 2008; Seltman & Mathews, 2012).

1.3. O sistema serotoninérgico

A disfunção dos sistemas de neurotransmissão constitui um domínio relevante nas demências neurodegenerativas, devido ao seu envolvimento no controlo do comportamento, na formação da memória e no processamento cognitivo em geral (Yang & Schmitt, 2001; Salmon, 2007). O sistema serotoninérgico é de particular interesse pois modela funções importantes no sistema nervoso central (SNC) envolvidas na regulação por exemplo dos comportamentos emocionais, dos cognitivos, da agressividade, das funções endócrinas, da memória e da aprendizagem (Lucki, 1998; Sanders-Bush *et al.*, 2003; Filip *et al.*, 2005; Nichols & Nichols, 2008; Terry *et al.*, 2008; Berger *et al.*, 2009). Por conseguinte, não é surpreendente que se tenha identificado alguma disfunção serotoninérgica numa variedade de doenças. Citam-se por exemplo a esquizofrenia, o comportamento suicida, um conjunto de distúrbios de ansiedade (pânico, obsessivo - compulsivos e fobia social) e ainda em doenças neurodegenerativas tais como a DA (Dubovsky & Thomas, 1995; Lucki, 1998; Filip *et al.*, 2005; Terry *et al.*, 2008). Adicionalmente, doenças relacionadas com a impulsividade ou com características de personalidade têm sido associadas com alterações na função da serotonina (5-HT), tais como a

depressão, agressividade e déficit de atenção (Dubovsky & Thomas, 1995; Lucki, 1998; Filip *et al.*, 2005; Terry *et al.*, 2008). Contudo, embora seja evidente a importância do sistema serotoninérgico na modulação comportamental, tem sido pouco estudado na DLFT: Sparks & Markesbery (1991) observaram uma diminuição na ligação da 5-HT aos recetores serotoninérgicos pré e pós - sinápticos nos lobos frontal e temporal, e hipotálamo; Miller *et al.* (1995) constataram que alguns sintomas associados com a DLFT (desejo por doces e carboidratos, ganho de peso, comportamento compulsivo) podiam estar relacionados com uma disfunção serotoninérgica; estudos revelaram que o ácido 5-hidroxiindol-acético (5-HIAA), o principal metabolito da 5-HT, estava diminuído no líquido cefalorraquidiano (CSF) de doentes com DLFT (Francis *et al.*, 1993; Sjögren *et al.*, 1998); Yang & Schmitt (2001) sugeriram o envolvimento do *raphe nuclei* serotoninérgico na DLFT; foram obtidos bons resultados em estudos baseados na administração de SSRIs para o tratamento da DLFT (Swartz *et al.*, 1997; Lebert & Pasquier, 1999; Moretti *et al.*, 2003; Ikeda *et al.*, 2004). Apesar dos poucos estudos existentes, parece configurar-se uma disfunção serotoninérgica na DLFT.

1.3.1. Serotonina

Em 1937 foi identificada uma substância fisiologicamente ativa nas células enterocromafinas da mucosa gastrointestinal designada por enteramina (Erspamer & Vialli, 1937). Nas duas décadas subsequentes, a referida substância foi isolada noutras locais para além do trato gastrointestinal (por exemplo no sangue) e as funções que desempenha nos órgãos foram caracterizadas (tais como no coração) (Erspamer, 1946; Erspamer, 1948; Erspamer & Boretti, 1951; Erspamer & Ghiretti, 1951; Erspamer & Ottolenghi, 1951; Erspamer & Vialli, 1951). Em 1948, Rapport *et al.* isolaram uma substância com propriedades vasoconstritoras e coagulantes que designaram 5-HT, não sabendo, na realidade, que correspondia à enteramina (Rapport *et al.*, 1948a; Rapport *et al.*, 1948b; Rapport *et al.*, 1948c; Rapport, 1949). Finalmente, Erspamer & Asero (1952) sintetizaram a 5-HT e confirmaram que era idêntica à enteramina isolada e purificada anteriormente. Posteriormente, a presença da 5-HT foi identificada no cérebro dos mamíferos e foi sugerido que funcionava como neurotransmissor (Twarog & Page, 1953; Brodie & Shore, 1957). Atualmente sabe-se que a principal fonte de 5-HT no organismo é o intestino, sendo produzida principalmente pelas células enterocromafinas, onde atua localmente, e é liberta para a corrente sanguínea permanecendo armazenada nas plaquetas (Sanders-Bush *et al.*, 2003; Ni & Watts, 2006; Nichols & Nichols, 2008). Entre 1 a 2% da quantidade de 5-HT existente no organismo localiza-se no SNC, sendo sintetizada localmente no cérebro uma vez

que não atravessa a barreira hematoencefálica (Twarog & Page, 1953; Brodie & Shore, 1957; Filip *et al.*, 2005; Ni & Watts, 2006; Nichols & Nichols, 2008; Berger *et al.*, 2009). As maiores concentrações de neurónios sintetizadores de 5-HT localizam-se no tronco cerebral (Sanders-Bush *et al.*, 2003; Filip *et al.*, 2005). Os neurónios serotoninérgicos são os principais constituintes do *raphe nuclei*, um conjunto heterogéneo de populações de neurónios com morfologias, projeções e características neuroquímicas distintas (Hornung, 2003) que, por numerosas projeções, enervam quase todas as áreas cerebrais (Lucki, 1998; Hornung, 2003; Filip *et al.*, 2005; Nichols & Nichols, 2008). A 5-HT (5-hidroxitriptamina) é formada nos corpos celulares dos neurónios serotoninérgicos a partir do aminoácido L-triptofano que, por sua vez, atravessa a barreira hematoencefálica por difusão facilitada através de um transportador de aminoácidos neutro (Pardridge & Oldendorf, 1975; Filip *et al.*, 2005; Nichols & Nichols, 2008). O anel do L-triptofano é hidroxilado a L-5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase (TPH) e transformado em 5-HT por descabroxilação da cadeia lateral pela enzima descarboxilase do aminoácido aromático (Figura 1.3) (Filip *et al.*, 2005; Ni & Watts, 2006; Nichols & Nichols, 2008). A despolarização nos terminais dos axónios serotoninérgicos induz o influxo de iões cálcio (Ca^{2+}) e a fusão das vesículas sinápticas que contêm armazenada a bioamina biossintetizada, capturada do citoplasma neuronal por ação do transportador monoamina vesicular, com a membrana celular (Figura 1.3) (Filip *et al.*, 2005; Nichols & Nichols, 2008). A 5-HT libertada difunde-se no espaço sináptico e interage com os recetores localizados na membrana pós-sináptica, iniciando-se a respetiva cascata de sinalização no interior da célula (Figura 1.3) (Nichols & Nichols, 2008). Gaddum & Picarelli (1957) foram os primeiros a sugerir a existência de mais do que um tipo de recetor de 5-HT: D que podia ser bloqueado pela dibenzilina e M pela morfina. Em 1993, o “*Serotonin Club Receptor Nomenclature Comitee (NCSC)*” propôs um novo sistema de nomenclatura baseado na informação operacional, estrutural e transducional (Humphrey *et al.*, 1993), subsequentemente aprovada pelo “*Receptor Nomenclature Comitee of the International Union of Pharmacology (NC-IUPHAR)*” (Hoyer *et al.*, 1994). A classificação em vigor tem vindo a ser progressivamente adaptada para incluir a informação disponível, sendo reconhecidos 7 classes ou famílias: 5-HTR₁ (5-HTR_{1A}, 5-HTR_{1B}, 5-HTR_{1D}, 5-HTR_{1E} e 5-HTR_{1F}), 5-HTR₂ (5-HTR_{2A}, 5-HTR_{2B} e 5-HTR_{2C}), 5-HTR₃ (5-HTR_{3A}, 5-HTR_{3B} e 5-HTR_{3C}), 5-HTR₄, 5-HTR₅ (5-HTR_{5A}, 5-HTR_{5B}), 5-HTR₆ e 5-HTR₇ (Sharman *et al.*, 2013). O 5-HTR₃ pertence à família dos recetores ionotrópicos e os restantes estão acoplados a proteínas G (GPCRs) (Sharman *et al.*, 2013). A ação sináptica é terminada pela recaptura da 5-HT do espaço sináptico para os neurónios serotoninérgicos pelo transportador membranal de 5-HT (SERT), localizado nos axónios, corpos e/ou dendrites, ficando armazenada nas vesículas e disponível

para iniciar um novo ciclo (Figura 1.3) (Filip *et al.*, 2005; Nichols & Nichols, 2008). A 5-HT que não é armazenada, permanecendo livre no citoplasma, é oxidada para aldeído e posteriormente para o metabolito 5-HIAA pela enzima intracelular monoamina oxidase (MAO), sobretudo do tipo A (Figura 1.3) (Filip *et al.*, 2005; Nichols & Nichols, 2008).

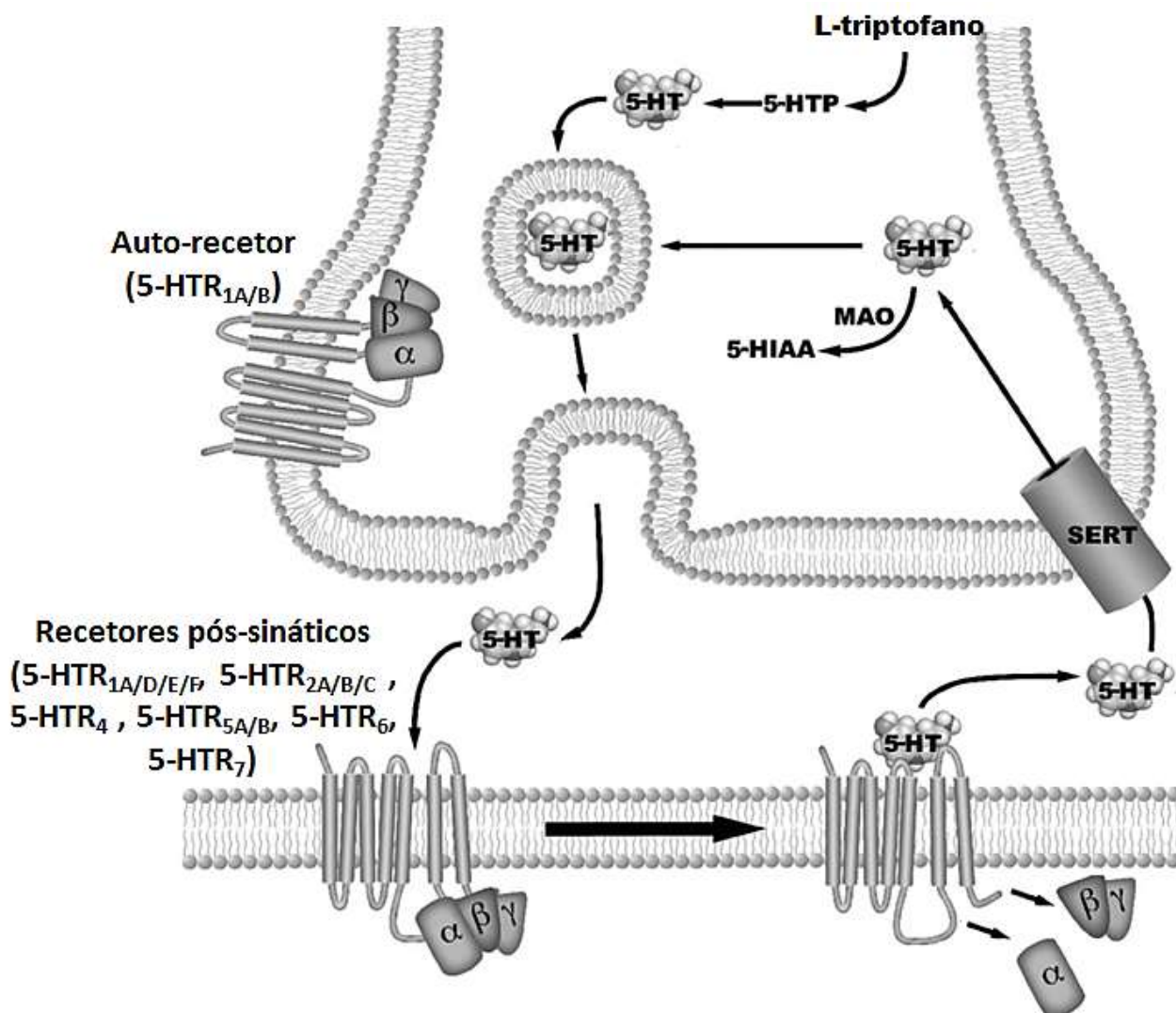


Figura 1.3 Representação esquemática da biossíntese, neurotransmissão e metabolismo da serotonina (5-HT). O aminoácido L-triptofano é hidroxilado a L-5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase e transformado em 5-HT através da enzima descarboxilase do aminoácido aromático. A despolarização nos terminais dos axônios serotoninérgicos induz o influxo de íons Ca^{2+} e a fusão das vesículas sinápticas que contêm armazenada a 5-HT biossintetizada com a membrana celular. A 5-HT difunde-se no espaço sináptico e interage com os receptores. A 5-HT é recapturada do espaço sináptico pelo transportador de 5-HT (SERT) e armazenada em vesículas. A 5-HT que permanece livre no citoplasma é catabolizada pela monoamina oxidase (MAO) para o metabolito ácido 5-hidroxiindol-acético (5-HIAA) (adaptado de Nichols & Nichols, 2008).

1.3.2. O recetor 5-HTR_{2A}

O recetor 5-HTR_{2A} tem recebido especial atenção devido ao papel importante que desempenha em algumas funções cognitivas, tais como na aprendizagem e na memória (Buhot *et al.*, 2000; Harvey, 2003). Além disso, tem-se mostrado relevante numa variedade de doenças neuropsiquiátricas, citando-se a esquizofrenia, doença bipolar, depressão, ansiedade, distúrbios obsessivo - compulsivos e suicídio (Norton & Owen, 2005). Vários estudos têm averiguado o envolvimento do 5-HTR_{2A} na DA: Reynolds *et al.* (1984) identificaram a redução do 5-HTR_{2A} no córtex frontal nas preparações *pós-mortem* de doentes com DA, Blin *et al.* (1993) no córtex temporal, parietal, temporo - parietal e occipital e Lai *et al.* (2005) sugeriram que a diminuição do 5-HTR_{2A} na região neocortical do lobo temporal poderia implicar um declínio cognitivo mais rápido na DA. No entanto, poucos estudos se têm focado no possível papel que este recetor pode desempenhar na etiopatogenia da DLFT: Procter *et al.* (1999) identificaram uma diminuição estatisticamente significativa do 5-HTR_{2A} nos lobos frontal e temporal enquanto Franceschi *et al.* (2005) observaram uma redução significativa da densidade cerebral do 5-HTR_{2A} no córtex das regiões orbitofrontal, frontal mesial e córtex cingulado. Variações de sequência no gene *HTR2A*, codificante do recetor 5-HTR_{2A}, têm sido estudadas como possíveis candidatos funcionais em várias doenças, tais como na esquizofrenia, distúrbios obsessivo - compulsivos, suicídio e DA (Norton & Owen, 2005). Por exemplo a variação de sequência c.102C>T no gene *HTR2A* tem sido associada a alucinações visuais e auditivas, psicose, depressão e delírios na DA (Holmes *et al.*, 1998; Nacmias *et al.*, 2001; Holmes *et al.*, 2003; Lam *et al.*, 2004). Sabendo que é frequente observar-se uma sobreposição clínica com a DLFT (Grazina *et al.*, 2004), é relevante averiguar o possível envolvimento do gene *HTR2A* na DLFT.

O gene *HTR2A* foi mapeado no cromossoma 13q14 - q21 (Hsieh *et al.*, 1990; Sparkes *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1992) e, até ao momento, foram identificadas as isoformas NM_000621.4 e NM_001165947.2 codificantes de proteínas com 471 (NP_000612) e 387 (NP_001159419) aminoácidos, respetivamente (UCSC Genome Browser, Fujita *et al.*, 2011). Conforme representado na Figura 1.4, a estrutura da isoforma NP_000612, obtida a partir da base de dados “G Protein - Coupled Receptor” (Vroling *et al.*, 2011), pode ser dividida em três domínios: extracelular (inclui o terminal amínico e os *loops* extracelulares E1, E2 e E3 entre as hélices transmembranares TM2 - 3, TM4 - 5 e TM6 - 7, respetivamente), de membrana (constituída pelas sete hélices transmembranares TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6 e TM7) e o intracelular (inclui o terminal carboxílico e os *loops* intracelulares I1, I2 e I3 entre as hélices transmembranares TM1 - 2, TM3 - 4 e TM5 - 6,

respetivamente). O domínio intracelular possui locais para interagir com várias proteínas G e efetores para a transdução dos sinais extracelulares (Raymond *et al.*, 2006). A principal via de tradução do sinal ocorre através da ativação da fosfolipase C- β (PLC- β) pela proteína $G\alpha_{q/11}$, resultando na hidrólise do fosfolípido membranar fosfatidilinositol-1,4-bifosfato (PIP2) nos segundos mensageiros inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG) (Berridge, 1983; Berridge *et al.*, 1983; Conn & Sanders-Bush, 1984; Roth *et al.*, 1984; Nichols & Nichols, 2008). As propriedades hidrofílicas do IP3 possibilitam a ativação dos canais de Ca^{2+} dependentes de ligandos na membrana do retículo endoplasmático, com a subsequente libertação de Ca^{2+} intracelular (Raymond *et al.*, 2006; Nichols & Nichols, 2008). O DAG, que é hidrofóbico, juntamente com o Ca^{2+} , ativa a proteína cinase C que fosforila numerosos substratos nos resíduos de serina e treonina (Azzi *et al.*, 1992; Raymond *et al.*, 2006; Nichols & Nichols, 2008). Nos humanos, o recetor 5-HTR_{2A} foi identificado em vários tecidos ou tipos celulares, tais como nas plaquetas (Cook *et al.*, 1994), nos intestinos (Kuemmerle *et al.*, 1995), na placenta (Sonier *et al.*, 2005), nos monócitos e linfócitos (Yang *et al.*, 2006), nos fibroblastos em cultura (Akin *et al.*, 2004; Myers *et al.*, 2007) e no cérebro (Hall *et al.*, 2000; Sugden *et al.*, 2009), contribuindo para vários processos fisiológicos, como por exemplo a contração muscular, a agregação plaquetar, a vasoconstrição e funções no SNC (Raymond *et al.*, 2006; Hannon & Hoyer, 2008).

Análise do gene *HTR2A* na Degenerescência Lobar Frontotemporal

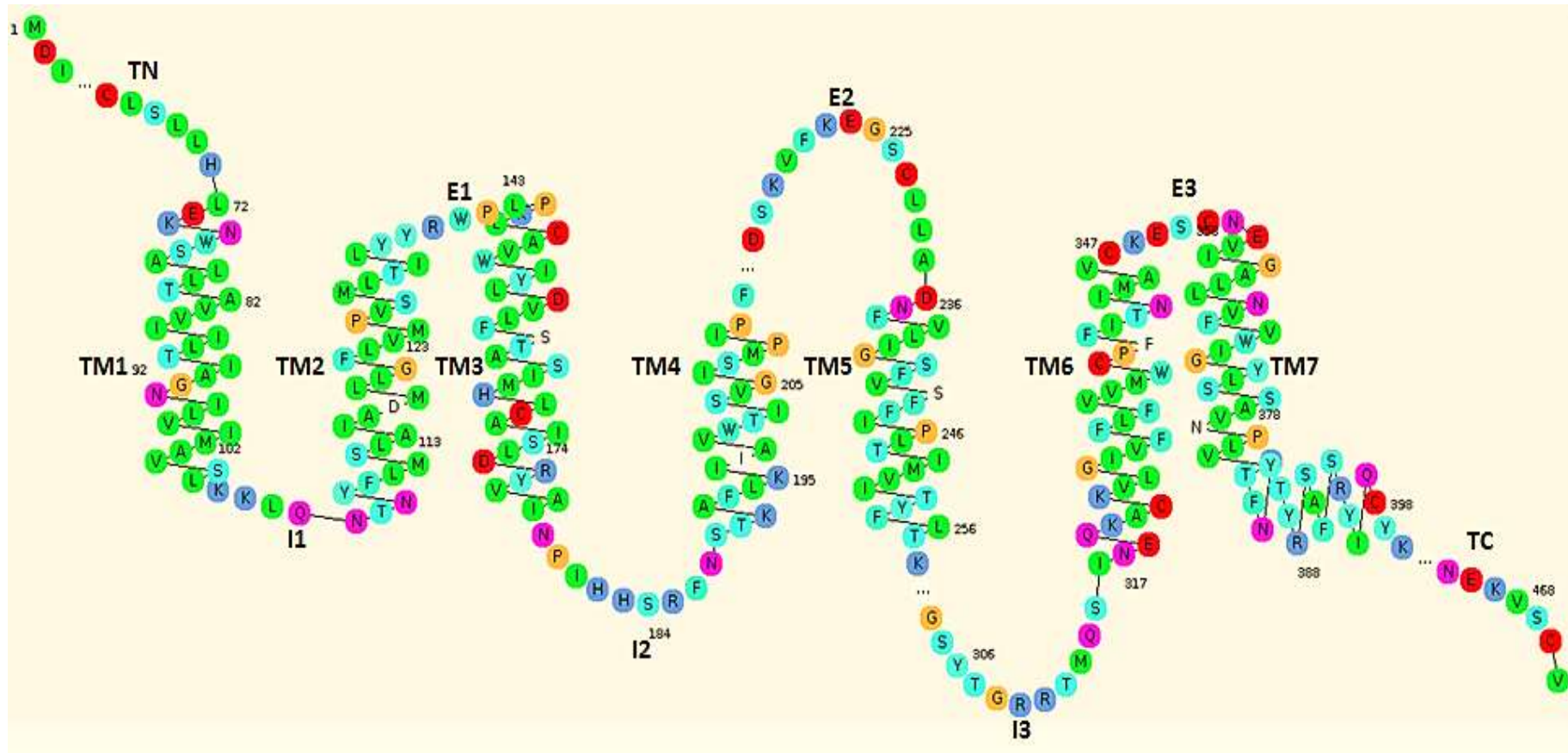


Figura 1.4 Representação da estrutura da isoforma NP_000621 do receptor 5-HT_{2A} humano obtida a partir da base de dados “*G Protein - Coupled Receptor*” (Vroiling *et al.*, 2011). As cores codificam propriedades dos resíduos (polar, neutra ou carregada; hidrofóbica, aromática ou alifática). Partes da sequência foram deletadas devido à presença de *loops* demasiado longos (representados por “...”). E - *loops* extracelulares, I - *loops* intracelulares, TC - terminal carboxílico, TM - hélices transmembranares e TN - terminal amínico.

2. Objetivos

Neste estudo pretendia-se averiguar o envolvimento do gene *HTR2A* na patogénese da DLFT. Com esta finalidade, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Analisar a sequência do gene *HTR2A* para identificação de variações de sequência que pudessem eventualmente estar associadas ao fenótipo clínico de DLFT.
- Correlacionar as variações de sequência no gene *HTR2A* que têm como consequência a alteração de aminoácido ou que se localizam em regiões reguladoras, com as características clínicas dos doentes, no sentido de analisar a possibilidade de constituírem fatores de risco para alguma particularidade da doença, bem como averiguar se ocorrem em frequências alteradas comparativamente a um grupo controlo, através de um estudo de associação caso - controlo.
- Analisar o impacto funcional da variação de sequência rs#3125, localizada na região reguladora não traduzida 3' (3'UTR) do gene *HTR2A*, no seguimento de um resultado significativo no estudo de associação, no grupo de mulheres com diagnóstico provável de vcDFT.

3. Amostragem e metodologias

3.1. Amostragem

O projeto em que se inclui este trabalho foi previamente aprovado pela Comissão de Ética para a Saúde do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, E.P.E.. Todos os participantes ou os seus representantes legais deram o seu consentimento informado, após receberem informações detalhadas sobre a natureza e objetivos do estudo.

3.1.1. Doentes com diagnóstico provável de Degenerescência Lobar Frontotemporal para análise do gene *HTR2A*

Neste estudo foram incluídos 70 doentes com diagnóstico provável de DLFT avaliados na Consulta de Demências do Serviço de Neurologia no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, E.P.E., de acordo com critérios padronizados (Neary *et al.*, 1998; Rascovsky *et al.*, 2011). Dos 70 doentes, 39 são mulheres e 31 homens, com idade compreendida entre os 38 e 82 anos, média de 63 ± 11 anos (Tabela 3.1).

3.1.2. Grupos para a correlação genótipo - fenótipo

Os processos correspondentes aos 70 doentes com diagnóstico provável de DLFT foram consultados e a informação relativa à variante clínica, história clínica pessoal e familiar, idade de início, depressão, agressividade e resultados dos testes de *Mini Mental State Examination* (MMSE) e *Clinical Dementia Rating* (CDR) foi examinada. Para estabelecer a idade de início precoce ou tardia, foi considerado o valor de corte nos 65 anos de idade, com base em McMurtray *et al.* (2006). Na análise descritiva das informações clínicas, foram calculadas frequências para as variáveis nominais, e médias e desvios - padrão para variáveis cujo nível de mensuração fosse intervalar.

Para constituir o grupo controlo, foram analisados 92 indivíduos que não apresentam quaisquer sinais de alterações neurológicas nem a doença em estudo, voluntários, não relacionados por graus de parentesco. O grupo incluiu 59 mulheres e 33 homens, com idades entre os 30 e 96 anos, média de 58 ± 14 (Tabela 3.1). Dos 92 indivíduos saudáveis, 55 tinham menos de 65 anos de idade.

Tabela 3.1 Distribuição do número de doentes com diagnóstico provável de DLFT e de indivíduos saudáveis por género, idades mínima e máxima, média e desvio-padrão.

Grupo	n	Feminino	Masculino	Mínimo (anos)	Máximo (anos)	Média	± DP
DLFT	70	39	31	38	82	63	11
Controlo	92	59	33	30	96	58	14

Abreviaturas: DLFT - Degenerescência Lobar Frontotemporal, n - número de indivíduos e DP - desvio-padrão.

3.1.3. Grupos para estudo de genómica funcional da variação de sequência rs3125

Foram incluídas 7 mulheres com diagnóstico provável de vcDFT e 10 mulheres saudáveis (Tabela 3.2), a partir da amostragem do estudo de correlação genótipo - fenótipo (Secção 3.1.2.). As idades oscilaram entre os 52 e 79 anos, com a média de 69 ± 11 no grupo das doentes, e entre os 37 e 64 anos, com a média de 45 ± 10 no grupo das mulheres saudáveis (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 Distribuição do número de mulheres com diagnóstico provável de vcDFT e saudáveis por idades mínima e máxima, média e desvio-padrão, para o estudo da variação de sequência rs3125.

Grupo	n	Mínimo (anos)	Máximo (anos)	Média	± DP
VcDFT	6	52	79	69	11
Controlo	10	37	64	45	10

Abreviaturas: VcDFT - variante comportamental da Demência Frontotemporal, n - número de indivíduos e DP - desvio-padrão.

3.2. Metodologias experimentais

3.2.1. Análise do gene *HTR2A* em doentes com diagnóstico provável de Degenerescência Lobar Frontotemporal

O gene *HTR2A* foi analisado comparativamente à sequência de referência, identificada pelo número de acesso NG_013011.1 na base de dados NCBI (Benson *et al.*, 2013), em 70 doentes com diagnóstico provável de DLFT para a identificação de variações de sequência. Com esta finalidade, o DNA correspondente a cada indivíduo foi isolado, previamente a este estudo, utilizando o método de extração por fenol-clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1987; Moore, 1997). A sequência do gene *HTR2A* (os exões e respetivas regiões adjacentes, bem como a presença da deleção identificada pelo rs71790269 (Sherry *et al.*, 2001)) foi analisada pelo método de sequenciação de Sanger (Sanger *et al.*, 1977; Smith *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1986; Prober *et al.*, 1987; Rosenblum *et al.*, 1997). A técnica de *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP, Deng, 1988) foi utilizada para confirmar as variações de sequência consideradas mais relevantes. As condições de trabalho incluíram áreas de pré e pós PCR separadas, para reduzir a amplificação de sequências através de aerossóis, conforme recomendado, evitando contaminações, (Bej *et al.*, 1991; Stirling, 2003a; Wallace, 2004; Viljoen *et al.*, 2005) e segundo a prática do Laboratório de acolhimento. O *Software Primer 3* (Rozen & Skaletsky, 2000) foi usado para o desenho dos *primers* (*Invitrogen, California, U.S.A.*).

3.2.1.1. DNA: isolamento e quantificação

Foram usadas amostras de DNA, da DNATECA do Laboratório de Bioquímica Genética, previamente extraídas a partir de 5 a 10mL de sangue periférico, por punção venosa, para tubos contendo o anti-coagulante ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA). A extração foi realizada de acordo com o método de extração por fenol-clorofórmio previamente descrito (Sambrook *et al.*, 1987; Moore, 1997). A concentração e o grau de pureza do DNA extraído foram estimadas por espectrofotometria no quantificador automático *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* e com o auxílio do *Software NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer v.3.7* (ambos da *Thermo Scientific, Delaware, U.S.A.*), usando 2 µL de DNA. A concentração do material genético foi determinada pela leitura da densidade ótica (DO) a 260 nm, correspondente à média da luz ultravioleta (UV) absorvida

pelas bases nitrogenadas dos nucleótidos individuais (Heptinstall & Rapley, 2000), e o grau de pureza foi avaliado pela razão da DO a 260 e a 280nm (DO_{260}/DO_{280}). A amostra foi considerada com pureza adequada quando o quociente estava compreendido entre 1,8 e 2,0, indicativo da absorção devida aos nucleótidos constituintes do DNA. Quando os valores foram inferiores a 1,8 ou superiores a 2,0 identificam a presença de contaminantes, tais como proteínas e fenol (Teare *et al.*, 1997; Bohorova *et al.*, 1999; Heptinstall & Rapley, 2000). A conversão das leituras de absorvância para a concentração baseia-se na lei de Beer-Lambert, considerando uma unidade de DO a 260nm correspondente a aproximadamente 50ng/ μ L de DNA de cadeia dupla e comprimento de trajetória da luz 0,1cm (Bohorova *et al.*, 1999; Heptinstall & Rapley, 2000; Thermo Scientific, 2008).

3.2.1.2. Análise da sequência do gene *HTR2A*

A técnica de PCR foi desenvolvida pelo Dr. Kary Banks Mullis em 1985 (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1986; Mullis & Faloona, 1987; Mullis, 1990) e tornou possível que a quantidade de DNA existente numa amostra deixasse de ser limitante na investigação ou no diagnóstico (Viljoen *et al.*, 2005). A PCR baseia-se no processo de replicação do DNA que ocorre *in vivo* e possibilita a amplificação rápida de sequências específicas, selecionadas do genoma, através de uma síntese *in vitro*, devido à complementaridade das bases de nucleótidos e no facto de que a dupla hélice se separa em cadeias únicas perante variações na temperatura acima de 90°C (Bej *et al.*, 1991; Bartlett & Stirling, 2003; Viljoen *et al.*, 2005; Fairchild *et al.*, 2006; Klepárník & Boček, 2007). Contudo, não existe um protocolo apropriado para todas as reações e, por conseguinte, as condições necessárias para a amplificação dos fragmentos delimitados por cada par de *primers* desenhados foram otimizadas de acordo com os seguintes parâmetros: qualidade e concentração do DNA molde, concentração dos *primers*, do magnésio (Mg^{2+}), dos desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), seleção e concentração da DNA polimerase, condições do programa, utilização de aditivos (como dimetilsulfóxido) e o recurso à técnica de “*hot start*” (Innis & Gelfand, 1990; Bej *et al.*, 1991; Grunenwald, 2003; Lübeck & Hoorfar, 2003). Neste estudo, foram usados 50ng de DNA, mistura de dNTPs a 2mM, 1 unidade de *Taq DNA polymerase* e o respetivo tampão (todos da *GE Healthcare, Buckinghamshire, U.K.*) e 2 pmol de cada *primer* (Tabela 3.3) para um volume total de 10 μ L. As amostras foram amplificadas no *TGradient thermocycler* (*Biometra, Göttingen, Germany*) de acordo com seguintes parâmetros: (passo 1) desnaturação a 95°C durante 5 minutos; (passo 2) 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, *annealing* à temperatura compreendida entre 60 a 64°C

durante 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos. Para a análise da deleção rs71790269 foi usada a enzima *Phire Hot Start II DNA Polymerase* (Finnzymes, Espoo, Finland), devido à processividade superior e capacidade de amplificar fragmentos de DNA até 7,5kb, de acordo com as instruções do fabricante (Finnzymes, 2008) e com os *primers* apropriados (Tabela 3.3). Para minimizar a ocorrência de contaminações foram incluídos controlos positivos (DNA molde, assegurando reprodutibilidade) e negativos (sem DNA).

Tabela 3.3 *Primers* desenhados para a amplificação das regiões alvo no gene *HTR2A*.

Posição	Direção	Fragmento (pb)
47471361	Forward	813
47470570	Reverse	
47470538*	Forward	1283
47469279	Reverse	
47470208	Forward	950
47469279	Reverse	
47466902	Forward	562
47466360*	Reverse	
47409952	Forward	1228
47408751	Reverse	

* *Primers* flanqueadores da deleção rs71790269. São obtidos fragmentos com 1298pb e 4202pb na presença e ausência da deleção respetivamente.

Posições obtidas na base de dados *UCSC Genome Browser* (Fujita *et al.*, 2011).

A presença dos produtos amplificados por PCR (Tabela 3.3) foi determinada através da sua visualização e separação por eletroforese, em gel *SeaKem® LE agarose* (Lonza, Maine, U.S.A.) a 1% w/v com 0,1 mg/L de brometo de etídeo (*Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden*), de acordo com o peso molecular, após a aplicação de corrente elétrica. No caso do DNA, este método é aplicável porque, na presença de um tampão a pH 8, as moléculas adquirem carga total negativa migrando em direção ao cátodo (Bowen *et al.*, 2000; Viljoen *et al.*, 2005). O tampão de aplicação [0,05% azul de bromofenol (*USB Corporation, Ohio, U.S.A.*), 50% glicerol (*Invitrogen™, California, U.S.A.*), 1%SDS e 0,1M EDTA (ambos da *Sigma-Aldrich, Missouri, U.S.A.*), pH 8] foi adicionado aos produtos de

amplificação na proporção de 1:1 e a mistura foi aplicada no gel polimerizado, bem como 2µL do marcador de peso molecular adequado (*Fermentas, California, U.S.A.*). A observação nítida dos fragmentos foi conseguida pela realização da eletroforese a 3 V/cm em tampão TBE1x (*Bio-Rad, Lisboa, Portugal*). As bandas de DNA foram visualizadas no transiluminador *Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ Imaging System*, devido à emissão de fluorescência laranja pelo brometo de etídeo sob irradiação UV quando intercalado entre as bases dos ácidos nucleicos (Bowen *et al.*, 2000; Viljoen *et al.*, 2005; Fairchild *et al.*, 2006), e o resultado foi registado pela captura das imagens através de uma câmara digital com recurso ao *Software Quantity One-4.6.9* (ambos da *Bio-Rad, Berkeley, U.S.A.*).

Os produtos amplificados por PCR foram purificados pelo método estabelecido por Werle *et al.* (1994), que consiste na adição de duas enzimas hidrolíticas: a exonuclease I (*Exo I*), que degrada os *primers* residuais através da atividade de nuclease 3'-5', e a *Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)*, que catalisa a remoção dos grupos 5' fosfato nos dNTPs livres inativando a sua incorporação nos produtos de sequenciação (Werle *et al.*, 1994; Dugan *et al.*, 2002). O procedimento consistiu na adição direta destas enzimas contidas na solução *ExoSAP-IT® (USB® Corporation, Ohio, U.S.A)*, 2µL/amostra. Contudo, a identificação da deleção rs71790269 em heterozigotia implicou a extração do gel de agarose da banda de 1298pb e posterior purificação sob centrifugação usando os tampões fornecidos no *kit* comercial *QIAquick® Gel extraction (Qiagen, Hilden, Germany)*. A presença do produto extraído foi confirmada num gel de agarose.

A sequenciação dos ácidos nucleicos é a análise mais precisa para a determinação dos nucleótidos de um fragmento de DNA amplificado por PCR (Viljoen *et al.*, 2005). Os fundamentos foram estabelecidos por Sanger e colaboradores (1977), quando desenvolveram o método baseado na interrupção controlada da replicação enzimática: um *primer* hibridizava com o DNA molde de cadeia única e era estendido pela DNA polimerase na presença de quatro dNTPs e de um terminador da cadeia ou 2', 3'-di-desoxi-nucleótido (ddNTP), dos quatro possíveis, marcado radioativamente. Os produtos de cada reação eram aplicados em paralelo num gel de acrilamida desnaturante, resolvidos por eletroforese e visualizados por autoradiografia, obtendo-se um padrão de bandas a partir do qual a sequência era lida. Atualmente, a marcação radioativa foi substituída por fluorescência, tendo sido o processo automatizado, usando quatro ddNTPs com fluorocromos diferentes, com o mesmo comprimento de onda de excitação e diferentes espectros de emissão (Smith *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1986; Prober *et al.*, 1987; Rosenblum *et al.*, 1997; Daniels, 2003; Stirling, 2003b; Metzker, 2005; Shendure *et al.*, 2008). Neste estudo, a reação de sequenciação foi realizada recorrendo ao *kit*

comercial *BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, California, U.S.A.), usando 10ng de produto de PCR purificado e o *primer* apropriado. A mistura foi colocada no *TGradient thermocycler* (Biometra, Göttingen, Germany), de acordo com os parâmetros definidos pela *Applied Biosystems* (Applied Biosystems, 2010a). Para além dos *primers* usados previamente para amplificar a região alvo (Tabela 3.3), foram usados também *primers* internos (posições 47409452 (*forward*), 47409435 (*reverse*) e 47409071 (*reverse*) na sequência do DNA, Fujita *et al.*, 2011), para assegurar a análise indubitável do gene *HTR2A* e confirmar as variações de sequência identificadas em ambos os sentidos.

Posteriormente, as amostras de DNA foram purificadas pelo método de precipitação com etanol (adaptado de Wallace, 2004) para remover os terminadores em excesso e sais constituintes do tampão que interferem com as injeções eletroforéticas e a sequenciação (Kheterpal & Mathies, 1999). Ao produto total da reação de sequenciação foram adicionados água e etanol (*Merck, Darmstadt, Germany*) a 95% (v/v), na proporção 5:4:16. A separação efetuou-se por centrifugação (*Sigma Laboratory Centrifuges 4K15C, Sartorius AG, Göttingen, Germany*) a 2500xg por 30 minutos. Adicionaram-se 75µL de etanol a 70% ao sedimento e centrifugou-se durante 10 minutos a 2000xg. Os sedimentos foram ressuspensos em 20µL do desnaturante *Hi-DiTM Formamide* e colocados no sequenciador automático *3130 Genetic Analyzer* (ambos da *Applied Biosystems, California, U.S.A.*). A separação dos fragmentos ocorreu de acordo com o tamanho, através de uma eletroforese capilar, com a elevada resolução a uma base, e a base terminal de cada fragmento foi identificada pelas emissões de fluorescência detetadas, resultantes da excitação provocada pelo laser de argon incidente nos fluoróforos dos ddNTPs (Stirling, 2003b; Metzker, 2005; Klepárník & Boček, 2007; Shendure *et al.*, 2008). Os dados produzidos foram importados e processados diretamente para o *Software 3130 Genetic Analyzer Data Collection v3.1*, as sequências obtidas foram analisadas com recurso ao *Software Sequencing Analysis v5.4* e comparadas com a sequência de referência através do *Software SeqScape v2.5* (todos da *Applied Biosystems, California, U.S.A.*). A qualidade e a análise das sequências foram confirmadas por um investigador qualificado e independente. As variações de sequência identificadas foram descritas de acordo com a *Human Genome Variation Society* (Dunnen & Antonarakis, 2001).

3.2.1.3. Confirmação das variações de sequência por PCR-RFLP

Os genótipos obtidos para as variações de sequência rs6312, rs1805055, rs6313, rs6314 e rs3125 foram confirmados por PCR-RFLP (Deng, 1988). As condições para amplificar por PCR as regiões que possuem as alterações rs6312, rs1805055 e rs6314 correspondem às descritas anteriormente (Secção 3.2.1.2.). A região flanqueadora da variação de sequência rs6313 foi amplificada usando os *primers* nas posições 47470046 (*forward*) e 47469724 (*reverse*) na sequência do DNA (Fujita *et al.*, 2011). Como nenhuma enzima de restrição (ER) reconhecia a região com a alteração rs3125, o *Software GAMPD* foi utilizado para a criação de um local artificial (Yang *et al.*, 2012). Por conseguinte, a região foi amplificada por PCR usando o *primer forward mismatch* na posição 47408852 e o *reverse* na 47408751 (Fujita *et al.*, 2011), de acordo com as condições referidas na Secção 3.2.1.2.. Posteriormente, o produto amplificado foi submetido à ação de uma ER (existente naturalmente nas bactérias defendendo-as contra a incorporação de DNA estranho pela clivagem em locais específicos) cuja sequência reconhecida contém a variação de sequência a analisar (Deng, 1988; Taylor & Taylor, 2004; Viljoen *et al.*, 2005; Klepárník & Boček, 2007; Ota *et al.*, 2007; Rasmussen, 2012). A presença ou ausência da sequência reconhecida pela ER resulta na formação de fragmentos com tamanhos diferentes (Rasmussen, 2012). Por conseguinte, a visualização dos produtos de digestão por eletroforese torna possível a identificação alélica (Rasmussen, 2012). O *Software In silico “simulation of molecular biology experiments”* (Bikandi *et al.*, 2004) foi utilizado para selecionar as ER apropriadas para genotipar as variações de sequência. Foi usada 1 unidade de ER (Tabela 3.4), em tampão 1x, para a análise de restrição do produto amplificado.

Tabela 3.4 Enzimas de restrição usadas para a genotipagem de cada variação de sequência e respectivos fragmentos produzidos.

RefSNP (rs#)	Enzimas de restrição	Alelo <i>wild type</i> (pb)	Alelo variante (pb)
rs6312	<i>Cfr13I</i>	699, 114	444, 255, 114
rs1805055	<i>MvaI</i>	549, 262, 139	549,401
rs6313	<i>MspI</i>	217, 125	342
rs6314	<i>Mva1269I</i>	944, 284	1228
rs3125	<i>HpyCH4III</i>	101, 23	124

A *HpyCH4III* é da New England BioLabs®, Massachusetts, U.S.A. e as restantes da Fermentas, Vilnius, Lithuania.

A reação de RFLP foi otimizada usando DNA amplificado de indivíduos portadores de genótipos diferentes determinados por sequenciação. Foi incluído um controlo positivo, DNA com o local de restrição da enzima de modo a assegurar a sua atividade, e um controlo não digerido, tal como é recomendado (Ota *et al.*, 2007). Após a incubação das misturas a 37°C na *GFL-3032 shaking incubator* (GFL, Burgwedel, Germany), durante a noite, os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 3%, 2,5%, 3,5% e 2% para as variações de sequência rs6312; rs1805055; rs6313 e rs3125; rs6314, respetivamente. A eletroforese foi realizada a 3V/cm durante 30 minutos e a 2,2V/cm por 90 minutos.

3.2.2. Correlação genótipo - fenótipo

As variações de sequência consideradas mais relevantes no gene *HTR2A* foram genotipadas nos grupos de doentes e de controlos pelos métodos de minissequenciação (Sokolov, 1990; Syvänen *et al.*, 1990; Kuppaswamy *et al.*, 1991; Pastinen *et al.*, 1996; Shumaker *et al.*, 1996; Tully *et al.*, 1996; Pastinen *et al.*, 1997; Piggee *et al.*, 1997), sequenciação de Sanger (Sanger *et al.*, 1977; Smith *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1986; Prober *et al.*, 1987; Rosenblum *et al.*, 1997) e PCR-RFLP (Deng, 1988). Finalmente, foi efetuada uma análise estatística para identificar variações de sequência que possam constituir fatores de risco para a DLFT.

3.2.2.1. Genotipagem das variações de sequência

O método de minissequenciação foi desenvolvido para a genotipagem de uma variação de sequência através da extensão pela DNA polimerase na extremidade 3' de um *primer* hibridizado na posição imediatamente adjacente à do local polimórfico a analisar de um nucleótido trifosfato marcado e complementar (Sokolov, 1990; Syvänen *et al.*, 1990; Kuppaswamy *et al.*, 1991). Atualmente, este método possibilita a genotipagem simultânea de várias alterações, em diferentes posições no DNA, através da utilização de *primers* com tamanhos diferentes (indicam a posição da alteração) e de ddNTPs marcados com corantes fluorescentes distintos (identificam o nucleótido polimórfico em cada local) (Pastinen *et al.*, 1996; Shumaker *et al.*, 1996; Tully *et al.*, 1996; Pastinen *et al.*, 1997). Este método foi utilizado para a genotipagem das variações de sequência rs6315, rs6316, rs6312, rs6310, rs7996679, rs1805055, rs6313 e rs6314 no grupo controlo. Com esta finalidade, os pares de *primers* caracterizados na Tabela 3.3, relativos aos fragmentos com 813pb,

1283pb, 950pb e 1228pb, foram usados para amplificar, por PCR, as regiões que possuem as variações de sequência rs6315, rs6316, rs6312; rs6310, rs7996679; rs1805055, rs6313; rs6314, respectivamente. A mistura constituída por 1µL de cada um dos quatro produtos amplificados foi purificada com *ExoSAP-IT*[®] (*USB*[®] *Corporation, Ohio, U.S.A.*) e posteriormente submetida à reação de minissequenciação. Foram usados os *primers* caracterizados na Tabela 3.5 (a extremidade 3' é complementar à base adjacente ao resíduo polimórfico) e o kit comercial *ABI Prism*[®] *SNaPshot*[™] *Multiplex* (*Applied Biosystems, California, U.S.A.*), de acordo com o protocolo recomendado (*Applied Biosystems, 2010b*).

Tabela 3.5 Caracterização dos *primers* desenhados para a reação de minissequenciação.

RefSNP (rs#)	Posição	Direção
rs6315	47471314	Forward
rs6312	47470794	Reverse
rs6310	47470353	Forward
rs1805055	47469969	Forward
rs7996679	47470294	Forward
rs6313	47469885	Reverse
rs6316	47471163	Reverse
rs6314	47408969	Reverse

Posições obtidas na base de dados *UCSC Genome Browser* (Fujita *et al.*, 2011).

Em todas as reações foram usados controlos positivo e negativo (sem DNA). O controlo positivo foi criado através da mistura constituída por DNA amplificado de doentes portadores de genótipos heterozigóticos para todas as variações de sequência a analisar, determinados previamente por sequenciação (Secção 3.2.1.2.). Para o rs6316, foi produzida uma amostra heterozigótica através da amplificação por PCR usando o *primer forward mismatch* localizado na posição 47471218, o *reverse* na 47471118 (Fujita *et al.*, 2011) e as condições descritas na Secção 3.2.1.2.. O produto total da reação de minissequenciação foi purificado para a remoção dos ddNTPs marcados livres (Syvänen, 1999; Makridakis & Reichardt, 2001), pela adição da *SAP* (*USB*[®] *Corporation, Ohio, U.S.A.*), 1 unidade/amostra. A mistura constituída por 1µL do produto purificado

com a *SAP*, *Hi-Di™ Formamide* e o marcador de peso molecular *LIZ-GeneScan™-120 LIZ® Size Standard* foi colocada no sequenciador automático *3130 Genetic Analyzer* (todos da *Applied Biosystems, California, U.S.A.*). Os dados produzidos foram importados e processados para o *Software 3130 Genetic Analyzer Data Collection v3.1* e analisados recorrendo ao *Software GeneMapper v4.1* (ambos da *Applied Biosystems, California, U.S.A.*), para a determinação dos genótipos.

As variações de sequência rs36212789, rs3125 e rs58145637 foram genotipadas no grupo controlo por sequenciação de Sanger, conforme descrito na Secção 3.2.1.2..

A variação de sequência rs6311 foi genotipada em ambos os grupos por PCR-RFLP conforme descrito na Secção 3.2.1.3.. A região flanqueadora foi amplificada por PCR usando os *primers* nas posições 47471694 (*forward*) e 47471118 (*reverse*) (Fujita *et al.*, 2011) na sequência do DNA. O produto amplificado (597pb) foi digerido pela ER *MspI* e os fragmentos visualizados num gel agarose a 3%: 362pb e 235pb na presença do alelo *wild type* (G) e 597pb do variante (A).

3.2.2.2. Análise estatística de dados genéticos

As variações de sequência genotipadas no grupo de doentes foram correlacionadas com as características clínicas respetivas. As frequências genotípicas e alélicas foram comparadas entre os subgrupos de género (feminino *versus* masculino), idade de início (ponto de corte 65 anos), depressão (positiva *versus* negativa), agressividade (positiva *versus* negativa), história familiar (positiva *versus* negativa), MMSE (presença *versus* ausência de défice cognitivo) e CDR (0,5+1 *versus* 2+3 e 0,5+1+2 *versus* 3).

Adicionalmente, as frequências genotípicas e alélicas correspondentes às variações de sequência genotipadas nos doentes foram comparadas com o grupo controlo, incluindo os respetivos subgrupos de género (mulheres doentes *versus* mulheres saudáveis, homens doentes *versus* homens saudáveis) e idade (idade de início dos sintomas inferior a 65 anos *versus* controlos com menos de 65 anos, idade de início dos sintomas igual ou superior a 65 anos *versus* controlos com 65 anos ou mais).

Todas as comparações foram realizadas recorrendo ao teste não paramétrico de χ^2 e o teste exato de Fisher, usando tabelas de contingência 2x3 para as frequências dos genótipos e 2x2 para as alélicas. Ambos os testes foram realizados segundo os algoritmos integrados no *Software GraphPad PRISM Version 3.00* (Motulsky, 1999), tendo sido definidos os limites dos intervalos de confiança de

95%. A estatística inferencial foi usada para testar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as variáveis, aceitando-se o nível de significância (p) inferior a 0,05. O equilíbrio de Hardy - Weinberg (EHW) foi averiguado em todas as amostragens pela comparação dos genótipos observados com os esperados. Esse fenômeno sustenta que, na ausência de migração, mutação ou seleção natural, que iriam alterar as frequências alélicas ao longo do tempo, e na presença de acasalamento aleatório numa grande população, os dois alelos de um indivíduo são considerados como não estando associados, sendo as frequências genotípicas em qualquer *locus* uma função simples das frequências alélicas, mantendo-se aproximadamente constantes entre gerações (Hardy, 1908; Weinberg, 1908).

3.2.3. Estudo de genômica funcional da variação de sequência rs3125

As plaquetas e as células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram isoladas de cada indivíduo incluído na amostragem caracterizada na Seção 3.1.3.. O RNA foi extraído, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado (Baltimore, 1970; Temin & Mizutani, 1970) e a presença de DNA genômico (DNAg) foi verificada por PCR (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1986; Mullis & Faloona, 1987; Mullis, 1990). O método de sequenciação de Sanger (Sanger *et al.*, 1977; Smith *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1986; Prober *et al.*, 1987; Rosenblum *et al.*, 1997) foi usado para averiguar a presença das isoformas do gene *HTR2A* e determinar a expressão alélica (transcrito) para a variação de sequência rs3125. O PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR) (Higuchi *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1993) foi utilizado para a determinação da expressão relativa das isoformas.

3.2.3.1. Isolamento das plaquetas e das células mononucleares de sangue periférico

Todo o material usado para o isolamento das plaquetas e das PBMCs foi tratado numa solução de 0,1% (v/v) do agente anti-*RNAse* di-etil-pirocarbonato (DEPC, *Sigma-Aldrich, Missouri, U.S.A.*) a 37°C, durante a noite. A solução foi decantada e o material colocado a 100°C, para secagem, durante pelo menos 40 minutos, para eliminar o DEPC residual (adaptado de Bartlett, 2003).

As plaquetas foram isoladas a partir de 20 - 30mL de sangue total em EDTA e de acordo com o método descrito por Wang *et al.* (2003) com algumas adaptações. Após a colheita do sangue, o plasma rico em plaquetas (PRP) foi imediatamente separado através da centrifugação (*Sigma*

Laboratory Centrifuges 4K15C, Sartorius AG, Göttingen, Germany) a 200xg durante 10 minutos, em dois passos consecutivos. No sentido de remover quaisquer células remanescentes de leucócitos e glóbulos vermelhos, o PRP foi novamente centrifugado a 140xg durante 15 minutos. O sobrenadante foi guardado e as células quantificadas no contador *Cell-Dyn 1400 (Abbott, Illinois, U.S.A.)*. O sedimento de plaquetas foi obtido pela centrifugação a 4500xg durante 10 minutos.

O sangue obtido após a remoção do PRP foi imediatamente usado para o isolamento das PBMCs através de um gradiente de densidade produzido pelo *Ficoll* (polímero de sacarose e epiclorohidrinia com elevado peso molecular) (Böyum, 1968), a partir do procedimento adaptado de de Wit & Sluiter (2009). O sangue foi diluído com igual volume de PBS-EDTA (140 mM NaCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8,1 mM Na_2HPO_4 , 2,7 mM KCl, 2 mM EDTA, pH 7,4, todos da *Sigma-Aldrich, Missouri, U.S.A.*). A mistura foi colocada em igual volume de *Ficoll-PaqueTM PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden)*, uma solução estéril que possui *Ficoll* e diatrizoato de sódio com a densidade, viscosidade e pressão osmótica necessárias para o isolamento rápido e simples das PBMCs (*Ficoll-Paque, 2007*), e centrifugada (*Sigma-302K, Sigma Laboratory Centrifuges, Osterode, Germany*) a 800xg durante 20 minutos. O plasma e os linfócitos foram diluídos pela adição de três volumes de solução PBS-EDTA a 4°C, seguindo-se a centrifugação (*Sigma Laboratory Centrifuges 4K15C, Sartorius AG, Göttingen, Germany*) a 140xg durante 15 minutos, a 4°C. O sedimento obtido foi ressuspenso com um volume de solução de lise de glóbulos vermelhos (RBCLB: 155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 1 mM Na_2EDTA , pH 7,4, todos da *Sigma-Aldrich, Missouri, U.S.A.*) a 4°C e a centrifugação repetida. Seguiram-se duas novas lavagens do sedimento obtido com PBS-EDTA a 4°C. O sedimento foi ressuspendido em 400µL de PBS-EDTA e as células quantificadas no contador *Cell-Dyn 1400 (Abbott, Illinois, U.S.A.)*. O sedimento de PBMCs purificadas foi obtido através da repetição da centrifugação.

3.2.3.2. RNA: isolamento e determinação da concentração, qualidade e integridade

A extração do RNA a partir das plaquetas e das PBMCs de cada indivíduo foi realizada em área restrita e recorrendo ao *kit* comercial *RNeasy[®] Mini (Qiagen, Hilden, Germany)*, cujo procedimento inclui os passos de lise, ligação do RNA à membrana e respetiva eluição em colunas de *spin* (Qiagen, 2010). A remoção do RNA do seu ambiente celular torna-o extremamente frágil e suscetível a degradação (Bustin & Nolan 2004; Mueller *et al.*, 2004; Schroeder *et al.*, 2006). Por conseguinte, a

integridade e a qualidade do RNA extraído foram determinadas recorrendo ao *kit* comercial *RNA 6000 Nano LabChip®* e ao *Software 2100 expert* (ambos da *Agilent Technologies, Waldbronn, Germany*), que correlaciona a fluorescência medida com a quantidade de RNA existente. O resultado é traduzido num eletroferograma e na apresentação dos valores de quocientes ribossômicos 28S/18S, de concentração e do número de integridade de RNA (RIN) compreendido entre 1 e 10 (Mueller *et al.*, 2004; Schroeder *et al.*, 2006). O valor de RIN adequado para análise posterior é acima de 8 (Mueller *et al.*, 2004; Schroeder *et al.*, 2006).

3.2.3.3. Síntese de DNA complementar

O RNA não pode funcionar como molde direto para a PCR e, por conseguinte, a descoberta de uma enzima capaz de sintetizar DNA a partir de RNA, designada por transcriptase reversa, possibilitou um aumento notório na compreensão da transcrição genética (Baltimore, 1970; Temin & Mizutani, 1970). Neste estudo, foi selecionado o protocolo no qual a transcrição reversa e a PCR ocorrem em passos separados (*two-step*), pois tem a vantagem de produzir um *pool* de cDNA estável que pode ser utilizado em várias experiências com alvos diferentes (Bustin, 2000; Ginzinger, 2002). A síntese de cDNA foi realizada recorrendo ao *kit* comercial *Maxima® First Strand cDNA Synthesis* (*Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania*), seguindo as recomendações do fornecedor (Thermo Scientific, 2012). Em cada reação foram incluídos dois controlos negativos: o RT⁻ (*reverse transcriptase minus*), que possibilita a deteção de uma possível contaminação com DNAg, inclui todos os reagentes para a reação de síntese de cDNA exceto a *Maxima Enzyme Mix*, que é substituída por água; o NTC (*no template control*), que averigua a ocorrência de contaminações nos reagentes, possui todos os componentes exceto o RNA molde, que foi substituído por água (Thermo Scientific, 2012).

3.2.3.4. Verificação da presença de DNA genómico

A presença de DNAg no cDNA sintetizado foi averiguada através da amplificação por PCR usando os *primers* produtores do fragmento com 1228pb, caracterizados na Tabela 3.3. Para além do cDNA sintetizado a partir do RNA de cada indivíduo, foram incluídos os controlos da síntese de cDNA: os respetivos RT⁻ e o NTC. Como o *primer* localizado na posição 47409952 (Tabela 3.3) é intrónico, a amplificação nas amostras de cDNA e RT⁻ identifica a presença de DNAg, uma vez que, após a transcrição, os intrões do RNA são removidos por *splicing* (Berg *et al.*, 2002). Nestas situações,

o RNA total extraído foi purificado através do *kit TURBO DNA-free™* (Ambion®, Texas, U.S.A.), que possibilita a eliminação do DNAg sem recorrer a fenol/clorofórmio, precipitação com álcool, calor ou adição de EDTA, que podem comprometer a estabilidade do RNA (life technologies™, 2012). A qualidade e a integridade do RNA purificado foram avaliadas (Secção 3.2.3.2.), o cDNA foi novamente sintetizado (Secção 3.2.3.3.) e a presença de DNAg verificada conforme descrito anteriormente.

3.2.3.5. Identificação das isoformas do gene *HTR2A* no DNA complementar

O método de sequenciação de Sanger (Secção 3.2.1.2.) foi usado para identificar as isoformas do gene *HTR2A*. A mistura constituída por 2µL de cDNA, dNTPs a 2mM, 1,25 unidades de *Taq DNA polymerase* e respetivo tampão, solução de MgCl₂ a 25mM (todos da *GE Healthcare, Buckinghamshire, U.K.*) e 5pmol de cada *primer* (Tabela 3.6) com o volume total de 25µL, foi amplificada de acordo com seguintes parâmetros: (passo 1) desnaturação a 95°C durante 5 minutos; (passo 2) 50 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, *annealing* a 58°C durante 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto. Para além das amostras de cDNA, foram incluídos controlos positivos (cDNA sintetizado a partir do RNA de fibroblastos que apresentam expressão elevada das isoformas do gene *HTR2A*, assegurando reprodutibilidade), negativo (sem cDNA) e os controlos da síntese do cDNA: os respetivos RT⁻ e o NTC. Os produtos amplificados foram extraídos do gel e purificados usando o *kit comercial QIAquick® Gel extraction (Qiagen, Hilden, Germany)*. O *primer* interno na posição 47409691 (*reverse*) (Fujita *et al.*, 2011) foi desenhado para a nítida e indubitável distinção das isoformas do gene *HTR2A*. A expressão alélica da variação de sequência rs3125 foi determinada em cada isoforma e confirmada por PCR-RFLP (Secção 3.2.1.3.).

Tabela 3.6 *Primers* desenhados para a amplificação por PCR das regiões alvo no cDNA de cada isoforma do gene *HTR2A*.

Posições	Direção	cDNA (pb)	DNAg (pb)
47469643	Forward	NM_000621.4: 1256	60910
47408751	Reverse		
47470834	Forward	NM_000621.4: 2015; NM_001165947.2: 1275	62108
47408751	Reverse		

Abreviaturas: cDNA - DNA complementar e DNAg - DNA genómico.

Os *primers* hibridizam em exões diferentes conforme recomendado (Kubista *et al.*, 2006).

3.2.3.6. Quantificação relativa de isoformas do gene *HTR2A* por PCR em tempo real

Higuchi *et al.* (1992, 1993) foram pioneiros na análise da cinética da PCR pela construção de um sistema que detetava os produtos à medida que se acumulavam: o brometo de etídeo intercalava-se nas cadeias duplas de DNA produzidas em cada reação de amplificação, o termociclador adaptado irradiava luz UV e a câmara de vídeo detetava a fluorescência resultante. Quanto menor o número de ciclos necessários para produzir uma fluorescência detetável, maior o número de sequências alvo. Esta técnica posteriormente designada por PCR em tempo real (RT-PCR) apresenta um vasto número de aplicações, por exemplo em estudos de expressão, na determinação do número de cópias do DNAg ou viral (Arya *et al.*, 2005; Dussault & Pouliot, 2006; Kubista *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2006). A expressão das isoformas do gene *HTR2A* foi analisada por RT-PCR de quantificação relativa, sendo a normalização feita recorrendo a genes de referência conforme descrito na Secção 3.2.3.6.1. (Ginzinger, 2002; Bustin & Nolan, 2004; Arya *et al.*, 2005; Dussault & Pouliot, 2006). Todo o procedimento decorreu no interior da câmara *DNA/RNA UV-CLEANER UVC/T-M-AR* (Grant-bio, California, U.S.A.).

3.2.3.6.1. Seleção dos genes de referência

Como não existe um gene de referência universal em todos os estudos (Thellin *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2000), foram testados 9 genes no cDNA de 1 doente e de 2 controlos: *ACTB* (*actin, beta*), *B2M* (*beta-2-microglobulin*), *18S* (*eucaryotic 18S rRNA*), *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), *HMBS* (*hydroxymethylbilane synthase*), *HPRT1* (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*), *TBP* (*TATA box binding protein*), *YWHAZ* (*tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide*) e *UBC* (*ubiquitin C*). Foi adicionado cDNA e *Taqman*[®] *Universal Master Mix II, no UNG* (Applied Biosystems, California, U.S.A.), nas proporções recomendadas pelo fornecedor, à *Taqman*[®] *Array 96-well FAST Plate Human Endogenous Controls* (Applied Biosystems, California, U.S.A.), que possui os *primers* liofilizados correspondentes a cada ensaio (life technologies[™], 2011). No termociclador *7500 Fast Real-Time PCR System* (ambos Applied Biosystems, California, U.S.A.) aplicou-se o seguinte programa: (passo 1) 95°C durante 10 minutos; (passo 2) 40 ciclos de amplificação a 95°C por 15 segundos e 1 minuto a

60°C (life technologies™, 2011). À medida que o produto é amplificado, o *Software 7500 v2.06* (*Applied Biosystems, California, U.S.A.*) analisa a fluorescência e define o parâmetro C_T (*threshold cycle*), o número do ciclo no qual a fluorescência começa a ser considerada como a identificação de uma relação linear (Bustin, 2000; Ginzinger, 2002; Bustin & Nolan, 2004; Arya *et al.*, 2005; Kubista *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2006). Quanto maior a quantidade do alvo no início da reação, menor o número de ciclos necessários para atingir o limiar de fluorescência (Bustin, 2000; Ginzinger, 2002; Arya *et al.*, 2005; Kubista *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2006). Os resultados foram analisados recorrendo ao algoritmo *geNorm* desenvolvido por Vandesompele *et al.* (2002), integrado no *Software GenEx* (Kubista *et al.*, 2012), que determina os genes que são expressos de um modo estável e uniforme em todas as amostras.

3.2.3.6.2. Ensaio experimental

Atualmente, as químicas de fluorescência incluem corantes que se ligam ao DNA e sondas específicas para a sequência, sendo os mais comuns *SYBR Green I* e *Taqman* respetivamente (Bustin, 2000; Ginzinger, 2002; Bustin & Nolan, 2004; Arya *et al.*, 2005). Embora o *SYBR Green I* possa ser usado com qualquer par de *primers* para qualquer sequência, emitindo fluorescência quando intercalado no DNA de cadeia dupla, não faz distinção, por exemplo, entre o alvo e produtos inespecíficos ou dímeros de *primers* (Bustin, 2000; Ginzinger, 2002; Bustin & Nolan, 2004; Arya *et al.*, 2005; Kubista *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2006). Por conseguinte, os transcritos do gene *HTR2A* foram quantificados com recurso aos ensaios de expressão *Taqman*® descritos na Tabela 3.7 (*Applied Biosystems, California, U.S.A.*). As sondas fluorescentes localizam-se em regiões *exon-exon boundary* (evitando a quantificação de DNAg) e os amplificados produzidos são pequenos (50pb - 150pb), associados, na literatura, a uma eficiência de amplificação superior (Bustin 2000; Ginzinger, 2002; Arya *et al.*, 2005).

Tabela 3.7 Ensaios usados para a quantificação das isoformas do gene *HTR2A*.

Isoformas identificadas	Identidade do ensaio	Fragmento (pb)
NM_000621.4; NM_001165947.2	Hs01033524_m1	99
NM_000621.4	Hs00167241_m1	77
NM_001165947.2	Hs03988529_m1	93

A placa com 20x *Taqman*[®] *Gene Expression Assay*, *Taqman*[®] *Universal Master Mix II*, no *UNG* (ambos da *Applied Biosystems, California, U.S.A.*) e cDNA, nas proporções recomendadas pelo fornecedor (*Applied Biosystems*[™] by *life technologies*[™], 2010), foi colocada no termociclador *7500 Fast Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems, California, U.S.A.*) de acordo com o programa: (passo 1) 95°C durante 10 minutos; (passo 2) 50 ciclos de amplificação a 95°C por 15 segundos e 1 minuto a 60°C (*Applied Biosystems*[™] by *life technologies*[™], 2010). Cada amostra de cDNA e dos respetivos RT⁻ e NTC, bem como os controlos negativos (NTC) do ensaio de expressão foram analisados em triplicado. Cada ensaio foi realizado em placas diferentes conforme proposto por Hellemans *et al.* (2007). O *Software 7500 v2.06* (*Applied Biosystems, California, U.S.A.*) analisou a fluorescência com a subsequente atribuição dos respetivos valores de C_T. Foi eliminado o valor de C_T que comparativamente aos restantes valores do triplicado variasse em mais 0,5 (Nolan *et al.*, 2006). Os produtos de qRT-PCR foram observados num gel de agarose.

3.2.3.6.3. Análise estatística de dados de genómica funcional

Foram calculadas as médias de C_T dos triplicados. Recorrendo ao *Software GenEx* (Kubista *et al.*, 2012) as quantidades detetadas de RNAm em cada amostra foram normalizadas, tendo por base a fórmula $\Delta C_T = C_{T\text{alvo}} - C_{T\text{referência}}$, e foram calculadas as expressões relativas comparativamente à amostra com maior expressão (menor C_T). A estatística descritiva foi utilizada para expressar os resultados num gráfico de barras \pm SEM (*standard error of the mean*), bem como para averiguar se os grupos seguiram uma distribuição gaussiana recorrendo ao teste de *Kolmogorov-Smirnov* (KS), passando o teste de normalidade quando $p \geq 0,05$. Quando os resultados não seguiram uma distribuição gaussiana, foi aplicado o teste não paramétrico de *Mann-Whitney (2-tail)*. Foi usado o teste-t (paramétrico) não emparelhado (*2-tail*) sempre que os dados seguiram uma distribuição gaussiana. Uma diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Análise do gene *HTR2A* em doentes com diagnóstico provável de Degenerescência Lobar Frontotemporal

4.1.1. Análise da sequência do gene *HTR2A*

A análise das sequências correspondentes aos exões e regiões adjacentes do gene *HTR2A* nos 70 doentes com diagnóstico provável de DLFT possibilitou a identificação de 17 variações de sequência diferentes, cuja localização em cada isoforma e as respectivas frequências genotípicas e alélicas estão discriminadas na Tabela 4.1. Apenas 4 variações de sequência não foram descritas na literatura (base de dados PubMed) ou nas bases de dados genéticos consultadas até ao momento. As restantes estão identificadas pelo código correspondente (refSNP: rs#, Sherry *et al.*, 2001). A Figura 4.1 representa esquematicamente a localização das variações de sequência identificadas nos doentes com diagnóstico provável de DLFT, por isoforma do gene *HTR2A*.

Tabela 4.1 Variações de sequência identificadas nos doentes com diagnóstico provável de DLFT (n=70), de acordo com as isoformas do gene *HTR2A* e respectivas frequências genotípicas e alélicas.

RefSNP (rs#)	NM_000621.4	NM_001165947.2	WW	WV	VV	W	V
rs6315	c.-833A>G	c.-345A>G	0,97	0,03	0,00	0,99	0,01
-----	c.-522A>T	c.-34A>T	0,99	0,01	0,00	0,99	0,01
rs6312	c.-344A>G	c.145A>G, p.Asn49Asp	0,89	0,11	0,00	0,94	0,06
rs6310	c.-311A>G	c.160+457A>G	0,89	0,11	0,00	0,94	0,06
rs7996679	c.-252G>T	c.160+516G>T	0,99	0,01	0,00	0,99	0,01
rs36212789	c.-251G>C	c.160+517G>C	0,99	0,01	0,00	0,99	0,01
rs1805055	c.74C>A, p.Thr25Asn	c.160+841C>A	0,99	0,01	0,00	0,99	0,01
rs6313	c.102C>T, p.Ser34=	c.160+869C>T	0,30	0,51	0,19	0,56	0,44
rs2296973	c.413-56C>A	c.161-56C>A	0,50	0,43	0,07	0,71	0,29
rs6305	c.516 C>T, p.Asp172=	c.264C>T, p.Asp88=	0,94	0,06	0,00	0,97	0,03
-----	c.613+86C>T	c.361+86C>T	0,99	0,01	0,00	0,99	0,01
-----	c.613+141A>G	c.361+141A>G	0,99	0,01	0,00	0,99	0,01
-----	c.1098T>C, p.Val366=	c.846T>C, p.Val282=	0,99	0,01	0,00	0,99	0,01
rs35224115	c.1239A>T, p.Thr413=	c.987A>T, p.Thr329=	0,99	0,01	0,00	0,99	0,01
rs6314	c.1354C>T, p.His452Tyr	c.1102C>T, p.His368Tyr	0,84	0,13	0,03	0,91	0,09
rs58145637	c.*69_*70insA	c.*69_*70insA	0,00	1,00	0,00	0,50	0,50
rs3125	c.*121G>C	c.*121G>C	0,72	0,24	0,04	0,84	0,16

Abreviaturas: W - alelo *wild type* e V - alelo variante.

Na isoforma NM_000621.4 foram identificadas 1 variação de sequência no promotor, 5 na região não traduzida 5' (5'UTR), 2 que promovem a substituição de aminoácido, 4 sinónimas, 3 intrónicas e 2 localizadas na 3'UTR do gene *HTR2A* (Tabela 4.1, Figura 4.1). Por sua vez, na isoforma NM_001165947.2, 1 variação de sequência localiza-se no promotor, 1 na 5'UTR, 2 promovem a substituição de aminoácido, 3 são sinónimas, 8 intrónicas e 2 estão localizadas na 3'UTR do gene *HTR2A* (Tabela 4.1, Figura 4.1). As variações de sequência identificadas correspondem maioritariamente à substituição de uma base nucleotídica, exceto a rs58145637 no qual ocorre a inserção de uma adenina (Tabela 4.1, Figura 4.1). As variações de sequência rs6315, rs6312, rs6310, rs7996679, rs36212789, rs1805055, rs6313, rs2296973, rs6305, rs35224115 e as 4 não descritas foram identificadas somente em homozigotia *wild type* e heterozigotia (Tabela 4.1, Figura 4.1). Os três genótipos possíveis foram detetados nas alterações genéticas rs6313, rs2296973, rs6314 e rs3125 (Tabela 4.1, Figura 4.1).

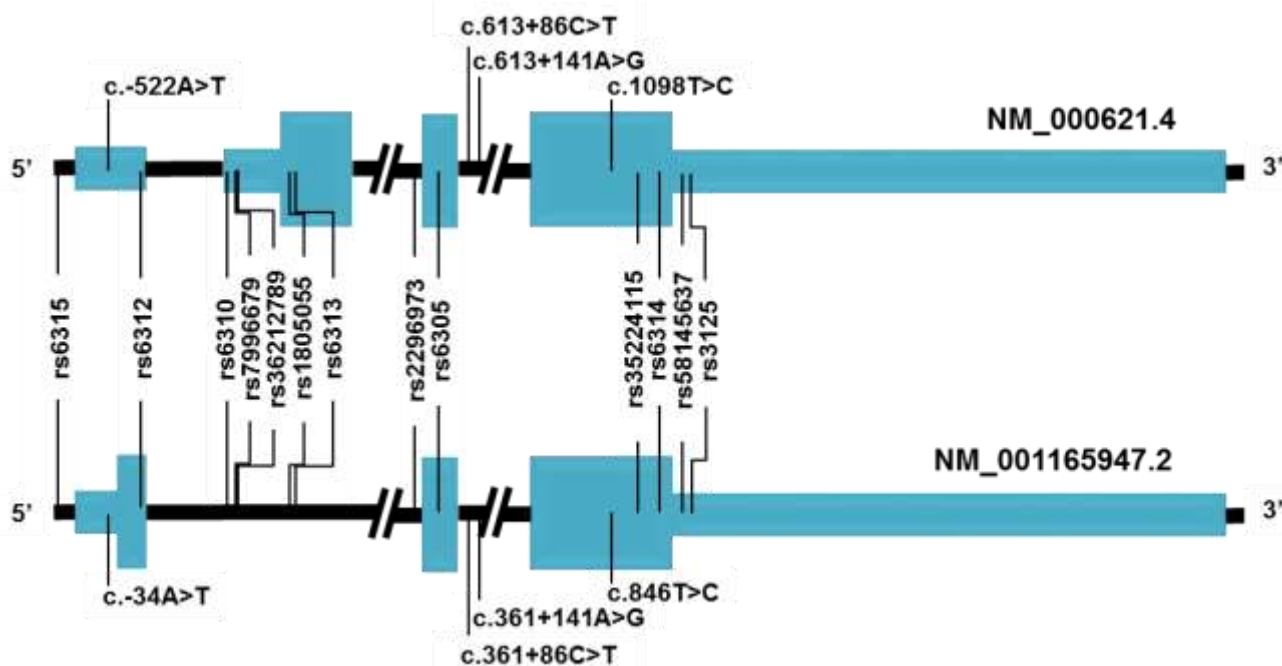


Figura 4.1 Representação esquemática da localização das variações de sequência identificadas nos doentes com diagnóstico provável de DLFT em cada isoforma do gene *HTR2A*. Barras azuis mais largas – exões, barras azuis mais estreitas – regiões não traduzidas e barra preta – intrões.

A Figura 4.2 representa um exemplo demonstrativo de um eletroferograma obtido para uma das amostras analisadas, em que foi detetada a variação de sequência rs3125 em heterozigotia.

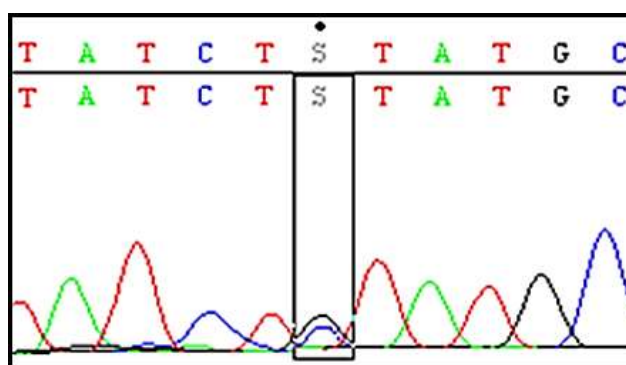


Figura 4.2 Eletroferograma que permite a identificação da variação de sequência rs3125 em heterozigotia.

Um doente aparentou ser portador da deleção rs71790269 em heterozigotia. A sequenciação do fragmento com a deleção (1298pb) foi exequível apenas com o *primer reverse* (marcado com o asterisco na Tabela 3.3) e foram obtidas simultâneamente duas sequências conforme representado na Figura 4.3A. Com o intuito de identificar as referidas regiões, o fragmento com a deleção foi digerido com a ER *MvaI* (de acordo com a metodologia descrita na Secção 3.2.1.3.), uma vez que reconhece a região representada na Figura 4.3A com o retângulo azul (nucleótidos CTGG sem picos sobrepostos) quando na posição adjacente e no lado esquerdo está presente o alelo C (seta preta, CCTGG). Portanto, a sequência que possui o alelo G (seta preta, GCTGG) não é reconhecida pela *MvaI*. O produto de digestão está representado na Figura 4.3B. As 4 bandas foram extraídas do gel e sequenciadas (Figura 4.3B).

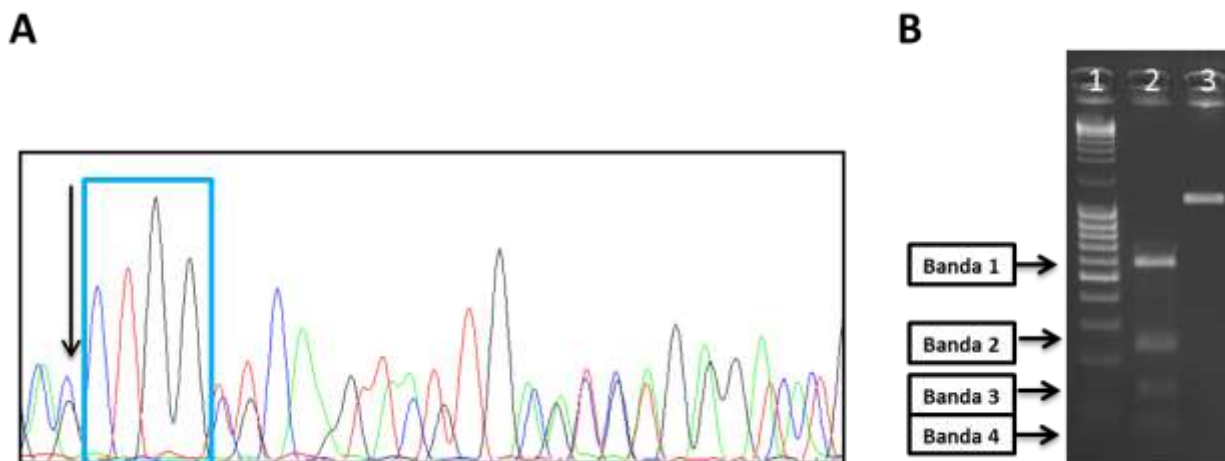


Figura 4.3 A: Eletroferograma correspondente ao fragmento com a deleção rs71790269. Retângulo azul - sequência de nucleótidos sem picos sobrepostos (CTGG) e seta preta - posição adjacente com os nucleótidos C e G sobrepostos. Esquema de cores da leitura dos nucleótidos: A - verde, T - vermelho, C - azul e G - preto. B: Representação em fotografia do eletroferograma obtido em gel de *SeaKem® LE agarose* a 2% correspondente ao fragmento digerido com a *MvaI*. Linhas de migração: 1 - marcador de peso molecular *MassRuler™ DNA Ladder Mix*, 2 - produto da digestão e 3 - controle não digerido.

Foram obtidas sequências somente para as bandas 2 e 3 (Figura 4.3B) e, à semelhança do que sucedeu anteriormente, apenas com o *primer reverse* (marcado com o asterisco na Tabela 3.3). Através da ferramenta BLAT (Kent, 2002) verificou-se que as sequências obtidas para as bandas 2 e 3 se localizam no intrão do gene *TSPAN9* (*tetraspanin 9*) localizado no cromossoma 12: a banda 2 corresponde à sequência na cadeia positiva e na região compreendida entre as posições 3332812 e 3332996, enquanto a banda 3 corresponde à sequência na cadeia negativa e entre as posições 3333876 e 3333937 (Figura 4.4). Após a identificação da localização das referidas bandas na sequência nucleotídica do gene *TSPAN9*, obtida na base de dados NCBI (Benson *et al.*, 2013), verificou-se que foi amplificada uma região com 1206pb cujos *primers* flanqueadores correspondem, neste caso excepcional, à sequência do *primer reverse* (Figura 4.4) Os locais de reconhecimento da ER *MvaI* foram assinalados (retângulos pretos) sendo produzidos os fragmentos com os seguintes tamanhos: 222pb, 124pb, 576pb, 59pb, 66pb, 55pb e 104pb (Figura 4.4). Após a comparação com o eletroferograma representado na Figura 4.3B, concluiu-se que às bandas 1, 2, 3 e 4 correspondem os fragmentos com 576pb; 222pb; 124pb e 104pb; 59pb, 66pb e 55pb, respectivamente. Embora a banda 3 inclua dois fragmentos, apenas um possui a sequência que inclui o *primer reverse*. Assim, constatou-se que nenhum doente é portador da deleção rs71790269.

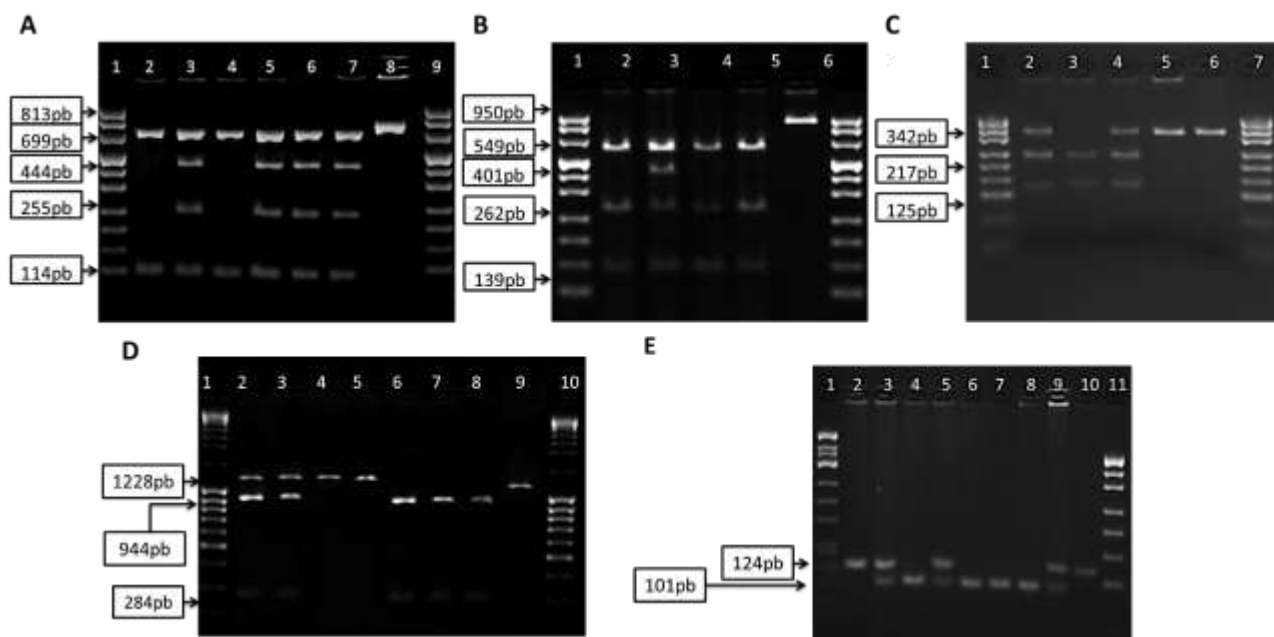


Figura 4.5 Representação em fotografia dos eletroforetogramas obtidos em gel de *SeaKem[®] LE agarose* a (A) 3%, (B) 2,5%, (C) 3,5%, (D) 2% e (E) 3,5% dos produtos digeridos pelas (A) *Cfr13I*, (B) *MvaI*, (C) *MspI*, (D) *Mva1269I* e (E) *HpyCH4III* para a genotipagem das variações de sequência rs6312, rs1805055, rs6313, rs6314 e rs3125, respectivamente. Linhas de migração - **A:** 1 e 9 marcador de peso molecular *pUC Mix Marker 8*, 2 e 4 genótipo *wild type* AA, 3, 5 e 6 genótipo heterozigótico AG, 7 controle positivo e 8 controle não digerido; **B:** 1 e 7 marcador de peso molecular *pUC Mix Marker 8*, 2 e 4 genótipo *wild type* CC, 3 genótipo heterozigótico CA, 5 controle positivo e 6 controle não digerido; **C:** 1 e 7 marcador de peso molecular *pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker 23*, 2 e 4 genótipo heterozigótico CT, 3 genótipo *wild type* CC, 5 controle positivo e 6 controle não digerido; **D:** 1 e 10 marcador de peso molecular *MassRuler[™] DNA Ladder Mix*, 2 e 3 genótipo heterozigótico CT, 4 e 5 genótipo variante TT, 6 e 7 genótipo *wild type* CC, 8 controle positivo e 9 controle não digerido; **E:** 1 e 10 marcadores de peso molecular *pUC Mix 8* e *ΦX174/Hinfl 10*, 2 genótipo variante CC, 3, 5 genótipo heterozigótico GC, 4, 6, 7, e 8 genótipo *wild type* GG, 9 controle positivo e 10 controle não digerido.

4.2. Correlação genótipo - fenótipo

4.2.1. Caracterização clínica dos doentes com diagnóstico provável de Degenerescência Lobar Frontotemporal

Os processos dos doentes com diagnóstico provável de DLFT foram consultados e a informação relativa à variante clínica (VcDFT, APNF, DCB e DS), idade de início dos sintomas e história familiar foi analisada, estando os respetivos resultados discriminados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Distribuição do número de doentes por gênero, idades mínima, máxima, média, desvio-padrão, idade de início dos sintomas e história familiar de acordo com a variante clínica.

Diagnóstico	n	F/M	Mínimo-máximo (anos)	Média (anos)	± DP	EOD/LOD (anos)	História familiar P/N
VcDFT	60	34/26	38-82	64	10	37/23	22/36
APNF	4	3/1	49-69	61	9	4/0	2/2
DCB	4	2/2	43-62	54	8	4/0	4/0
DS	2	0/2	46-54	50	6	2/0	0/2
Total	70	39/31	38-82	63	11	47/23	28/40

Abreviaturas: VcDFT - variante comportamental da Demência Frontotemporal, APNF - Afasia Progressiva Não Fluente, DCB - Degenerescência Corticobasal, DS - Demência Semântica, n - número de indivíduos, F - feminino, M - masculino, DP - desvio-padrão, EOD - doença de início precoce, LOD - doença de início tardio, P - positiva e N - negativa.

Dos 70 doentes analisados, 60 (34 mulheres e 26 homens) apresentaram diagnóstico provável de vcDFT, 4 (3 mulheres e 1 homem) de APNF, 4 (2 mulheres e 2 homens) de DCB e 2 (ambos homens) de DS (Tabela 4.2). Verificou-se que 47 indivíduos iniciaram a manifestação dos sintomas numa idade inferior aos 65 anos e 23 doentes após essa idade (Tabela 4.2). Dos 70 doentes avaliados, 28 apresentaram história familiar positiva e 40 negativa (Tabela 4.2).

As informações relativas à manifestação das características clínicas de depressão e agressividade, bem como os resultados obtidos no MMSE, de acordo com a presença (1) ou ausência (0) de déficit cognitivo, e CDR, associado a um critério de inclusão a pontuação mínima de 0,5 na escala de classificação global, estão descritas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 Distribuição do número de doentes pelas características de diagnóstico de depressão, agressividade, MMSE (0 para ausência; 1 para presença, de déficit cognitivo) e CDR de acordo com a variante clínica.

Diagnóstico	Depressão	Agressividade	MMSE	CDR
	P/N	P/N	0/1	0,5/1/2/3
VcDFT	21/26	23/25	22/38	5/30/14/11
APNF	3/1	2/2	1/3	0/2/0/2
DCB	1/2	0/1	1/3	0/3/0/1
DS	0/2	1/1	0/2	0/1/0/1
Total	25/31	26/29	24/46	5/36/14/15

Abreviaturas: VcDFT - variante comportamental da Demência Frontotemporal, APNF - Afasia Progressiva Não Fluente, DCB - Degenerescência Corticobasal, DS - Demência Semântica, P - positiva, N - negativa, MMSE - *Mini Mental State Examination* e CDR - *Clinical Dementia Rating*.

Foi identificado comportamento depressivo em 25 doentes e sinais de agressividade em 26 (Tabela 4.3). De acordo com os resultados do MMSE, verificou-se que 46 indivíduos apresentaram déficit cognitivo, estando ausente nos restantes 24 (Tabela 4.3). As pontuações de CDR correspondentes a 0,5, 1, 2 e 3 foram obtidas em 5, 36, 14 e 15 doentes respetivamente (Tabela 4.3).

A caracterização clínica dos 70 doentes com diagnóstico provável de DLFT revelou que a maioria apresenta a vcDFT (n=60), sendo reduzido o número de indivíduos com as restantes variantes (Tabela 4.2). Por conseguinte, na análise de correlação genótipo - fenótipo foi apenas incluído o grupo com diagnóstico provável de vcDFT.

4.2.2. Genotipagem das variações de sequência

Das variações de sequência identificadas nos doentes com vcDFT foram selecionadas para o estudo de correlação genótipo-fenótipo as que podem resultar na alteração da expressão do gene *HTR2A*, localizadas no promotor (rs6315 em ambas as isoformas) e nas regiões não traduzidas (rs6312, rs6310, rs7996679 e rs36212789 na NM_000621.4; rs58145637 e rs3125 em ambas as isoformas), ou na sequência da proteína (rs6312 na NM_001165947.2, rs1805055 na NM_000621.4 e rs6314 em ambas), bem como a alteração silenciosa rs6313 devido ao seu suposto envolvimento em várias doenças humanas (Norton & Owen, 2005). Foram adicionados o rs6311 e rs6316 devido à localização no promotor. Na Tabela 4.4 apresentam-se os resultados de genotipagem para as referidas variações de sequência.

Análise do gene *HTR2A* na Degenerescência Lobar Frontotemporal

Tabela 4.4 Resultados de genotipagem das variações de sequência definidas nos doentes com diagnóstico provável de vcDFT e controlos pelas isoformas do gene *HTR2A* e respetivas frequências genóticas e alélicas.

RefSNP (rs#)	NM_000621.4	NM_001165947.2	VcDFT (n=60)					Controlos (n=92)				
			WW	WV	VV	W	V	WW	WV	VV	W	V
rs6311	c.-998G>A	c.-510G>A	0,32	0,46	0,22	0,55	0,45	0,25	0,51	0,24	0,51	0,49
rs6315	c.-833A>G	c.-345A>G	0,97	0,03	0,00	0,98	0,02	0,91	0,09	0,00	0,96	0,04
rs6316	c.-743A>G	c.-255A>G	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
rs6312	c.-344A>G	c.145A>G, p.Asn49Asp	0,88	0,12	0,00	0,94	0,06	0,85	0,14	0,01	0,92	0,08
rs6310	c.-311A>G	c.160+457A>G	0,88	0,12	0,00	0,94	0,06	0,85	0,14	0,01	0,92	0,08
rs7996679	c.-252G>T	c.160+516G>T	0,98	0,02	0,00	0,99	0,01	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
rs36212789	c.-251G>C	c.160+517G>C	0,98	0,02	0,00	0,99	0,01	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
rs1805055	c.74C>A, p.Thr25Asn	c.160+841C>A	0,98	0,02	0,00	0,99	0,01	0,97	0,03	0,00	0,98	0,02
rs6313	c.102C>T, p.Ser34=	c.160+869C>T	0,32	0,46	0,22	0,55	0,45	0,25	0,50	0,25	0,50	0,50
rs6314	c.1354C>T, p.His452Tyr	c.1102C>T, p.His368Tyr	0,85	0,13	0,02	0,92	0,08	0,87	0,13	0,00	0,93	0,07
rs58145637	c.*69_*70insA	c.*69_*70insA	0,00	1,00	0,00	0,50	0,50	0,00	1,00	0,00	0,50	0,50
rs3125	c.*121G>C	c.*121G>C	0,70	0,25	0,05	0,83	0,18	0,62	0,36	0,02	0,80	0,20

Abreviaturas: VcDFT - variante comportamental da Demência Frontotemporal, n - número de indivíduos, W - alelo *wild type* e V - alelo variante.

Em ambos os grupos, a variação de sequência rs6316 foi identificada somente em homozigotia *wild type* e a rs58145637 em heterozigotia (Tabela 4.4). Nos doentes, as alterações genéticas rs6315, rs6312, rs6310, rs7996679, rs36212789 e a rs1805055 foram detetadas em homozigotia *wild type* e heterozigotia, e as restantes (rs6311, rs6313, rs6314 e rs3125) nos três genótipos possíveis (Tabela 4.4). Nos controlos, as alterações genéticas rs7996679, rs36212789 foram identificados em homozigotia *wild type*, rs6315, rs1805055 e rs6314 em em homozigotia *wild type* e heterozigotia e as rs6311, rs6312, rs6310, rs6313 e rs3125 nos três genótipos possíveis (Tabela 4.4). A Figura 4.6 representa o eletroferograma obtido na otimização da reação de minissequenciação (*SNaPshot*) utilizando uma mistura de amostras com genótipos heterozigóticos para todas as alterações genéticas. Uma vez que a heterozigotia (CA) para o rs1805055 foi identificada através de dois picos quase sobrepostos (Figura 4.6), tornando a genotipagem dúbia, os genótipos foram confirmados através do método PCR-RFLP, conforme descrito na Secção 3.2.1.3..

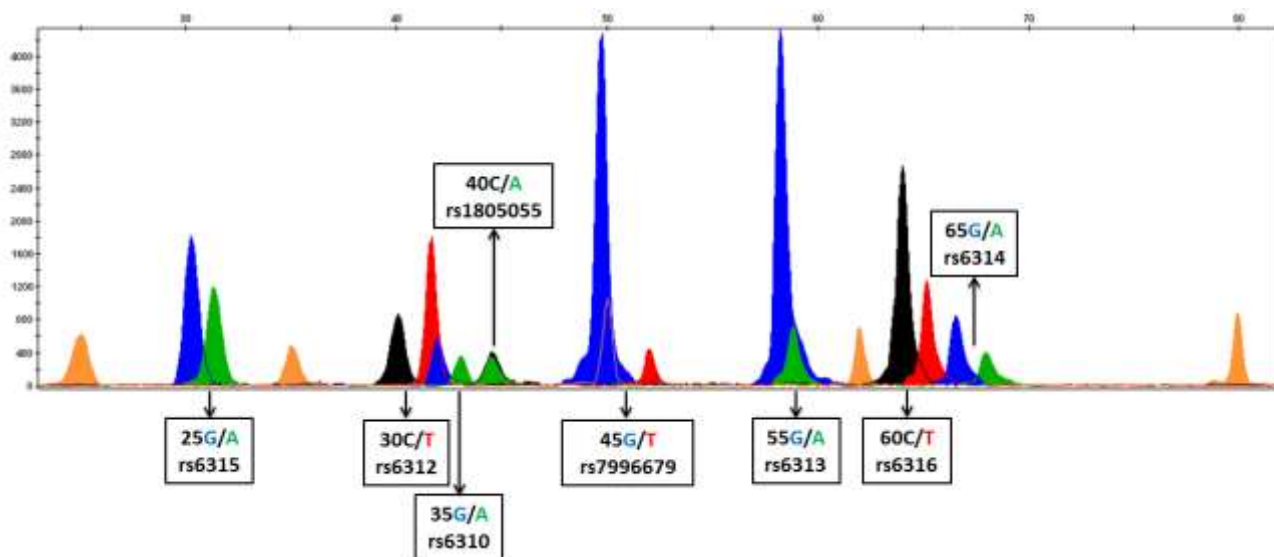


Figura 4.6 Eletroferograma correspondente à otimização da reação de minissequenciação utilizando uma mistura de amostras com genótipos heterozigóticos para as variações de sequência rs6315, rs6312, rs6310, rs1805055, rs7996679, rs6313, rs6316 e rs6314. Picos laranja - marcador de peso molecular *LIZ-GeneScan™-120 LIZ® Size Standard*. Esquema de cores da leitura dos nucleótidos: A- verde, T- vermelho, C - preto e G - azul.

A Figura 4.7 representa um exemplo demonstrativo dos resultados da aplicação da técnica de PCR-RFLP, utilizada para a genotipagem da variação de sequência rs6311 nos grupos de doentes e

controles. O genótipo das amostras 2 e 3 é heterozigótico (GA), da 4 *wild type* (GG) e da 5 variante (AA) (Figura 4.7).

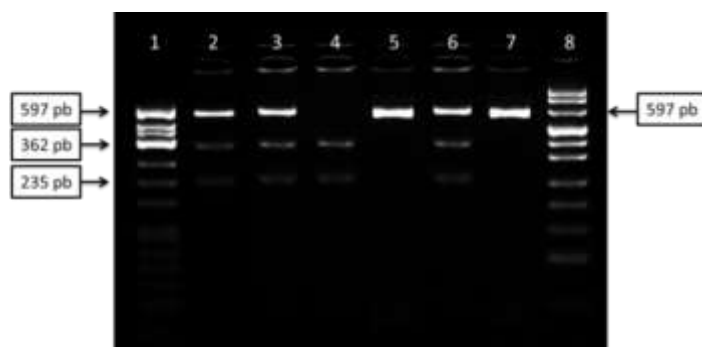


Figura 4.7 Representação em fotografia do eletroferograma obtido em gel de *Seakem LE agarose* a 3% pela digestão com a *MspI* para a genotipagem da variação de sequência rs6311. Linhas de migração - 1 e 10 marcadores de peso molecular Φ X174/*Hinfl* 10 e *pUC Mix 8*, 2 e 3 genótipo heterozigótico GA, 4 genótipo *wild type* GG, 5 genótipo variante AA, 6 controlo positivo e 7 controlo não digerido.

4.2.3. Análise estatística de dados genéticos

As variações de sequência identificadas nos doentes com diagnóstico provável de vcDFT foram correlacionadas com as características clínicas respetivas. Não foram identificados valores estatisticamente significativos nas comparações das frequências genotípicas e alélicas entre os subgrupos de género (feminino *versus* masculino), idade de início (ponto de corte 65 anos), depressão (positiva *versus* negativa), agressividade (positiva *versus* negativa), história familiar (positiva *versus* negativa), MMSE (presença *versus* ausência de défice cognitivo) e CDR (0,5+1 *versus* 2+3; 0,5+1+2 *versus* 3), estando discriminados nas Tabelas 4.5 e 4.6 os resultados obtidos para as variações de sequência mais relevantes. Todas as amostragens estavam em EHW.

As variações de sequência genotipadas foram comparadas entre os grupos de doentes com vcDFT e controlo, incluindo os respetivos subgrupos de género (mulheres doentes *versus* mulheres saudáveis; homens doentes *versus* homens saudáveis) e idade (EOD *versus* controlos com menos de 65 anos; LOD *versus* controlos com 65 anos ou mais), estando expressos nas Tabelas 4.7 e 4.8 os resultados obtidos para as variações de sequência mais relevantes. Todas as amostragens estavam em EHW.

Análise do gene *HTR2A* na Degenerescência Lobar Frontotemporal

Tabela 4.5 Resultados da correlação entre os subgrupos de gênero, idade de início, história familiar, depressão, agressividade, MMSE (*Mini Mental State Examination*: ausência (0) ou presença (1) de déficit cognitivo) e CDR (*Clinical Dementia Rating*) dos doentes com diagnóstico provável de vcDFT (n=58) para as variações de sequência rs6311, rs6313 e rs2296973.

VcFTD (n)	RefSNP	rs6311/rs6313			Valor de p	rs6311/rs6313		Valor de p (alelos)	rs2296973			Valor de p	rs2296973		Valor de p (alelos)
		WW	WV	VV	(genótipos)	W	V		WW	WV	VV	(genótipos)	W	V	
Gênero:															
Feminino (34)		0,29	0,47	0,24	0,739	0,53	0,47	0,453	0,53	0,41	0,06	0,916	0,74	0,26	1,000
Masculino (24)		0,37	0,46	0,17		0,60	0,40		0,54	0,38	0,08		0,73	0,27	
Idade de início:															
Precoce (35)		0,29	0,48	0,23	0,687	0,53	0,47	0,447	0,54	0,40	0,06	0,908	0,74	0,26	0,831
Tardia (23)		0,39	0,44	0,17		0,61	0,39		0,52	0,39	0,09		0,72	0,28	
História familiar:															
Positiva (20)		0,30	0,45	0,25	0,881	0,52	0,48	0,844	0,55	0,45	0,00	0,408	0,78	0,22	0,654
Negativa (36)		0,31	0,50	0,19		0,56	0,44		0,53	0,39	0,08		0,72	0,28	
Depressão:															
Positiva (21)		0,38	0,48	0,14	0,415	0,62	0,38	0,299	0,57	0,38	0,05	0,907	0,76	0,24	1,000
Negativa (26)		0,31	0,38	0,31		0,50	0,50		0,58	0,34	0,08		0,75	0,25	
Agressividade:															
Positiva (23)		0,31	0,52	0,17	0,528	0,56	0,44	1,000	0,56	0,44	0,00	0,106	0,78	0,22	0,486
Negativa (25)		0,40	0,36	0,24		0,58	0,42		0,56	0,28	0,16		0,70	0,30	
MMSE:															
0 (22)		0,41	0,41	0,18	0,586	0,61	0,39	0,442	0,59	0,32	0,09	0,604	0,75	0,25	0,830
1 (36)		0,28	0,50	0,22		0,53	0,47		0,50	0,44	0,06		0,72	0,28	
CDR:															
0,5 (5)		0,40	0,20	0,40		0,50	0,50		0,80	0,00	0,20		0,80	0,20	
1 (30)		0,33	0,47	0,20	0,5+1 vs 2+3: 0,770	0,57	0,43	0,5+1 vs 2+3: 1,000	0,56	0,37	0,07	0,5+1 vs 2+3: 0,276	0,75	0,25	0,5+1 vs 2+3: 0,523
2 (13)		0,23	0,62	0,15	0,5+1+2 vs 3: 0,857	0,54	0,46	0,5+1+2 vs 3: 0,806	0,46	0,54	0,00	0,5+1+2 vs 3: 0,636	0,73	0,27	0,5+1+2 vs 3: 0,408
3 (10)		0,40	0,40	0,20		0,60	0,40		0,40	0,50	0,10		0,65	0,35	

Abreviaturas: VcDFT - variante comportamental da Demência Frontotemporal, n - número de indivíduos, W – alelo *wild type*, V - alelo variante e vs - *versus*.

Análise do gene *HTR2A* na Degenerescência Lobar Frontotemporal

Tabela 4.6 Resultados da correlação entre os subgrupos de gênero, idade de início, história familiar, depressão, agressividade, MMSE (*Mini Mental State Examination*: ausência (0) ou presença (1) de déficit cognitivo) e CDR (*Clinical Dementia Rating*) dos doentes com diagnóstico provável de vcDFT (n=58) para as variações de sequência rs6314 e rs3125.

VcDFT (n)	RefSNP	rs6314			Valor de p (genótipos)	rs6314		Valor de p (alelos)	rs3125			Valor de p (genótipos)	rs3125		Valor de p (alelos)	
		WW	WV	VV		W	V		WW	WV	VV		W	V		
Gênero:																
Feminino (34)		0,85	0,15	0,00	0,479	0,93	0,07	0,739	0,79	0,18	0,03	0,359	0,88	0,12	0,203	
Masculino (24)		0,83	0,13	0,04		0,90	0,10		0,63	0,33	0,04		0,79	0,21		
Idade de início:																
Precoce (35)		0,88	0,09	0,03	0,276	0,93	0,07	0,515	0,77	0,20	0,03	0,610	0,87	0,13	0,433	
Tardia (23)		0,78	0,22	0,00		0,89	0,11		0,65	0,31	0,04		0,80	0,20		
História familiar:																
Positiva (20)		0,95	0,05	0,00	0,322	0,98	0,02	0,154	0,65	0,25	0,10	0,151	0,78	0,22	0,187	
Negativa (36)		0,80	0,17	0,03		0,89	0,11		0,75	0,25	0,00		0,88	0,12		
Depressão:																
Positiva (21)		0,81	0,19	0,00	0,638	0,90	0,10	1,000	0,81	0,19	0,00	0,315	0,90	0,10	0,162	
Negativa (26)		0,81	0,15	0,04		0,88	0,12		0,65	0,27	0,08		0,79	0,21		
Agressividade:																
Positiva (23)		0,70	0,30	0,00	0,068	0,85	0,15	0,187	0,69	0,22	0,09	0,258	0,80	0,20	0,137	
Negativa (25)		0,92	0,04	0,04		0,94	0,06		0,84	0,16	0,00		0,92	0,08		
MMSE:																
0 (22)		0,92	0,04	0,04	0,135	0,93	0,07	0,740	0,68	0,32	0,00	0,337	0,84	0,16	1,000	
1 (36)		0,81	0,19	0,00		0,90	0,10		0,75	0,19	0,06		0,85	0,15		
CDR:																
0,5 (5)		0,80	0,00	0,20	0,5+1 vs 2+3: 0,276	0,80	0,20	0,5+1 vs 2+3: 0,515	0,80	0,20	0,00	0,5+1 vs 2+3: 0,275	0,90	0,10	0,5+1 vs 2+3: 0,305	
1 (30)		0,90	0,10	0,00		0,95	0,05		0,63	0,34	0,03		0,80	0,20		
2 (13)		0,85	0,15	0,00		0,92	0,08		0,77	0,23	0,00		0,88	0,12		0,5+1+2 vs 3: 0,735
3 (10)		0,70	0,30	0,00		0,85	0,15		0,90	0,00	0,10		0,90	0,10		

Abreviaturas: VcDFT - variante comportamental da Demência Frontotemporal, n - número de indivíduos, W – alelo *wild type*, V - alelo variante e vs - *versus*.

Análise do gene *HTR2A* na Degenerescência Lobar Frontotemporal

Tabela 4.7 Resultados da correlação entre os doentes com diagnóstico provável de vcDFT (D) e os controles (Ct) para as variações de sequência rs6311 e rs6313.

Grupos (n)	RefSNP	rs6311			Valor de p (genótipos)	rs6311		Valor de p (alelos)	rs6313			Valor de p (genótipos)	rs6313		Valor de p (alelos)
		WW	WV	VV		W	V		WW	WV	VV		W	V	
Totais:															
D (58)		0,33	0,46	0,21	0,584	0,56	0,44	0,406	0,33	0,46	0,21	0,567	0,56	0,44	0,343
Ct (92)		0,25	0,51	0,24		0,51	0,49		0,25	0,50	0,25		0,50	0,50	
Mulheres:															
D (34)		0,29	0,47	0,24	0,664	0,53	0,47	0,761	0,29	0,47	0,24	0,664	0,53	0,47	0,761
Ct (59)		0,22	0,56	0,22		0,50	0,50		0,22	0,56	0,22		0,50	0,50	
Homens:															
D (24)		0,37	0,46	0,17	0,626	0,60	0,40	0,446	0,37	0,46	0,17	0,495	0,60	0,40	0,342
Ct (33)		0,30	0,42	0,28		0,52	0,48		0,30	0,40	0,30		0,50	0,50	
<65 anos:															
EOD (35)		0,29	0,48	0,23	0,767	0,53	0,47	0,647	0,29	0,48	0,23	0,746	0,53	0,47	0,541
Ct (55)		0,22	0,53	0,25		0,48	0,52		0,22	0,51	0,27		0,47	0,53	
≥65 anos:															
LOD (23)		0,39	0,44	0,17	0,747	0,61	0,39	0,570	0,39	0,44	0,17	0,747	0,61	0,39	0,570
Ct (37)		0,30	0,49	0,21		0,54	0,46		0,30	0,49	0,21		0,54	0,46	

Abreviaturas: n - número de indivíduos, EOD - doença de início precoce, LOD - doença de início tardio, W - alelo *wild type* e V - alelo variante.

Análise do gene *HTR2A* na Degenerescência Lobar Frontotemporal

Tabela 4.8 Resultados da correlação entre os doentes com diagnóstico provável de vcDFT (D) e controlos (Ct) para as variações de sequência rs6314 e rs3125.

RefsNP Grupos (n)	rs6314			Valor de p (genótipos)	rs6314		Valor de p (alelos)	rs3125			Valor de p (genótipos)	rs3125		Valor de p (alelos)
	WW	WV	VV		W	V		WW	WV	VV		W	V	
Totais:														
D (58)	0,84	0,14	0,02	0,443	0,91	0,09	0,504	0,72	0,24	0,04	0,306	0,84	0,16	0,360
Ct (92)	0,87	0,13	0,00		0,94	0,06		0,62	0,36	0,02		0,80	0,20	
Mulheres:														
D (34)	0,29	0,47	0,24	0,753	0,93	0,07	0,761	0,79	0,18	0,03	0,047^a	0,88	0,12	0,037^b
Ct (59)	0,88	0,12	0,00		0,94	0,06		0,54	0,43	0,03		0,75	0,25	
Homens:														
D (24)	0,83	0,13	0,04	0,485	0,90	0,10	0,740	0,63	0,33	0,04	0,344	0,79	0,21	0,298
Ct (33)	0,85	0,15	0,00		0,92	0,08		0,76	0,24	0,00		0,88	0,12	
<65 anos:														
EOD (35)	0,88	0,09	0,03	0,385	0,93	0,07	1,000	0,77	0,20	0,03	0,071	0,87	0,13	0,084
Ct (55)	0,87	0,13	0,00		0,94	0,06		0,54	0,44	0,02		0,76	0,24	
≥65 anos:														
LOD (23)	0,78	0,22	0,00	0,485	0,89	0,11	0,504	0,65	0,31	0,04	0,804	0,80	0,20	0,616
Ct (37)	0,86	0,14	0,00		0,93	0,07		0,73	0,24	0,03		0,85	0,15	

Abreviaturas: n - número de indivíduos, EOD - doença de início precoce, LOD - doença de início tardio, W - alelo *wild type* e V - alelo variante.

* Valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

^a A *Odds ratio* (OR) entre as mulheres com vcDFT e as mulheres saudáveis para os genótipos GG e GC é de 3,516 (1,258 - 9,828) e para os genótipos GG e CC de 1,688 (0,1449 - 19,66).

^b A OR entre as mulheres com vcDFT e as mulheres saudáveis para os alelos G e C corresponde a 2,444 (1,046 - 5,710).

Foram identificadas diferenças estatisticamente significativas nas comparações das frequências genotípicas e alélicas correspondentes à variação de sequência rs3125 para as mulheres com diagnóstico provável de vcDFT *versus* mulheres saudáveis ($p=0,047$ e $0,037$ respectivamente, Tabela 4.8). A Figura 4.8 representa graficamente as respectivas distribuições.

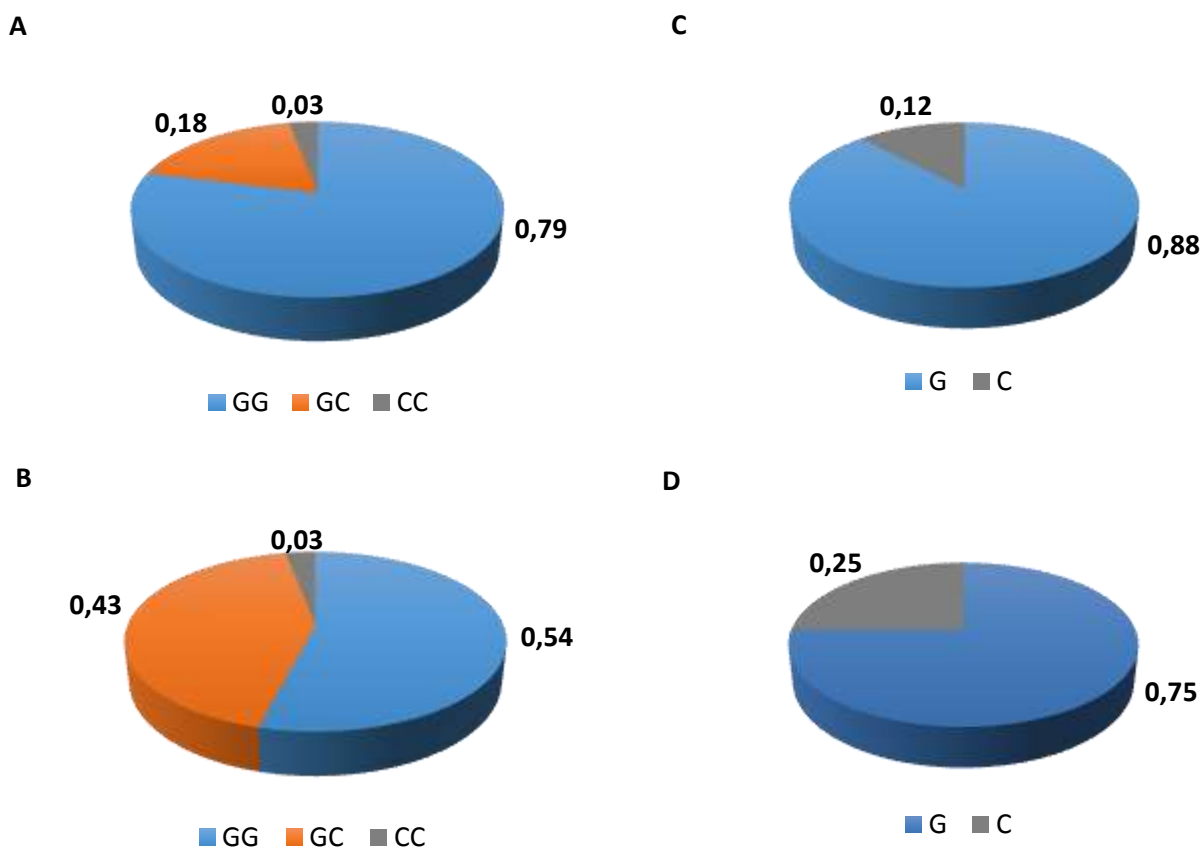


Figura 4.8 Representação gráfica das frequências genotípicas (A e B) e alélicas (C e D) referentes à variação de sequência rs3125 nos subgrupos de mulheres com diagnóstico provável de vcDFT (A e C) e mulheres saudáveis (B e D).

Os resultados obtidos indicam que as mulheres com diagnóstico provável de vcDFT possuem frequências do genótipo GG (0,79) e do alelo G (0,88) significativamente superiores, comparativamente às mulheres saudáveis (0,54 e 0,75 respectivamente) (Figura 4.8). Por outro lado, nas mulheres saudáveis as frequências do genótipo GC (0,43) e do alelo C (0,25) são superiores, relativamente às doentes (0,18 e 0,12 respectivamente) (Figura 4.8).

4.3. Estudo de genômica funcional da variação de sequência rs3125

4.3.1. Determinação da concentração, qualidade e integridade do RNA

A qualidade e a integridade do RNA extraído das plaquetas e das PBMCs de cada indivíduo foram determinadas no *Agilent 2100 Bioanalyzer*. A Figura 4.9 representa um exemplo demonstrativo dos resultados obtidos para um indivíduo.

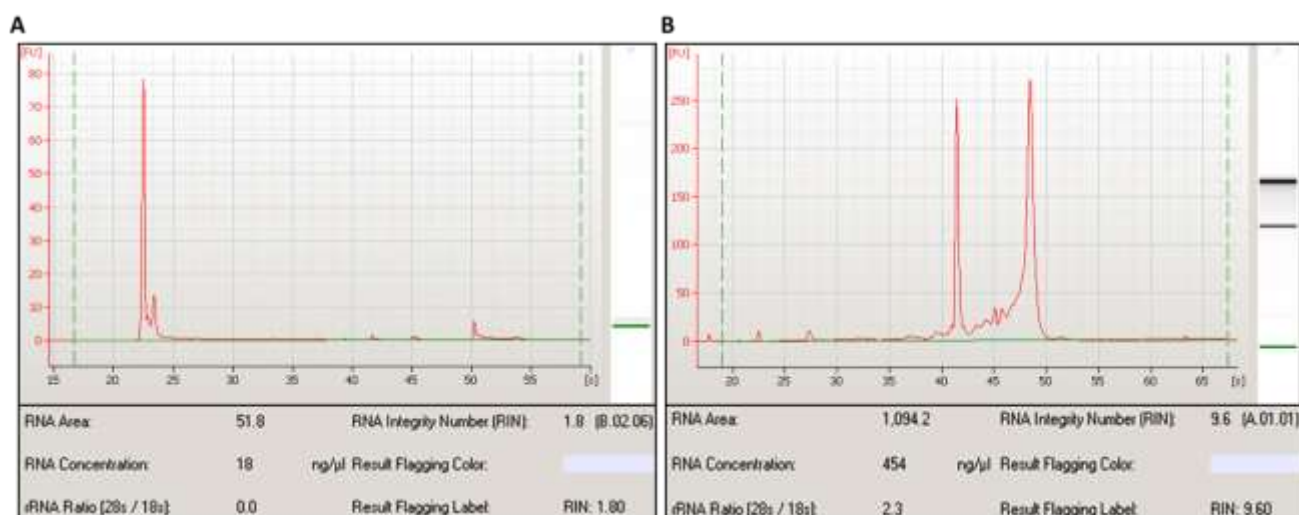


Figura 4.9 Representação da atribuição das categorias de integridade e respectivos eletroferogramas correspondentes ao RNA extraído a partir de (A) plaquetas e (B) PBMCs de um indivíduo. FU - unidades de fluorescência e s - segundos.

Não foram identificados os picos correspondentes à fluorescência dos fragmentos de RNA ribossomal (RNAr) 18S e 28S no RNA das plaquetas, bem como das respectivas bandas no eletroferograma (Figura 4.9A). Os resultados são coerentes com a quantidade reduzida de moléculas de RNA que foram extraídas. A avaliação do RNA das PBMCs revelou picos bem definidos de RNAr 18S e 28S, bem como das respectivas bandas (de aproximadamente 5Kb e 2kb em tamanho) no eletroferograma, com valores de RIN superiores a 9 (Figura 4.9B).

4.3.2. Verificação da presença de DNA genómico

A presença de DNAg no cDNA sintetizado a partir do RNA extraído das plaquetas e das PBMCS foi averiguada por PCR utilizando um *primer* intrónico. A presença de DNAg foi identificada apenas no cDNA correspondente ao RNA extraído das PBMCS, uma vez que, conforme exemplificado na Figura 4.10B, ocorreram amplificações nas amostras de cDNA e RT⁻ (B: 2 e 3). O referido resultado não foi devido a contaminações provenientes da manipulação, pois não foram identificadas amplificações nos controlos negativos (B: 4 e 7, Figura 4.10B). Por conseguinte, as amostras foram tratadas com *DNase*. A análise do *Agilent 2100 Bioanalyzer* indicou que o RNA tratado permaneceu com a qualidade e a integridade desejável, sendo semelhante ao da Figura 4.9B. O resultado da determinação da presença de DNAg no cDNA sintetizado a partir do RNA tratado foi similar ao da Figura 4.10A. Portanto, a *DNase* removeu eficazmente o DNAg.

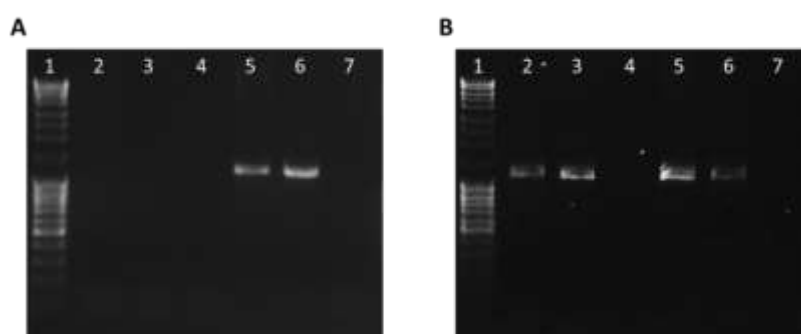


Figura 4.10 Representação em fotografia dos eletroforetogramas obtidos em gel de *Seakem LE agarose* a 1% para a identificação da presença de DNAg no cDNA sintetizado a partir do RNA extraído das (A) plaquetas e (B) PBMCS. Linhas de migração no gel A e B - 1 marcador de peso molecular *Mass Ruler DNA Ladder Mix*, 2 cDNA, 3 RT⁻, 4 controlo negativo da reação de síntese de cDNA, 5 e 6 controlos positivos da PCR e 7 controlo negativo da PCR.

4.3.3. Identificação das isoformas do gene *HTR2A* no DNA complementar

As duas isoformas do gene *HTR2A* foram identificadas por sequenciação em todas as amostras de cDNA sintetizado a partir do RNA das plaquetas, conforme exemplificado na Figura 4.11. Não foi identificada qualquer isoforma nas amostras de cDNA sintetizado a partir do RNA extraído das PBMCS de mulheres doentes e saudáveis.

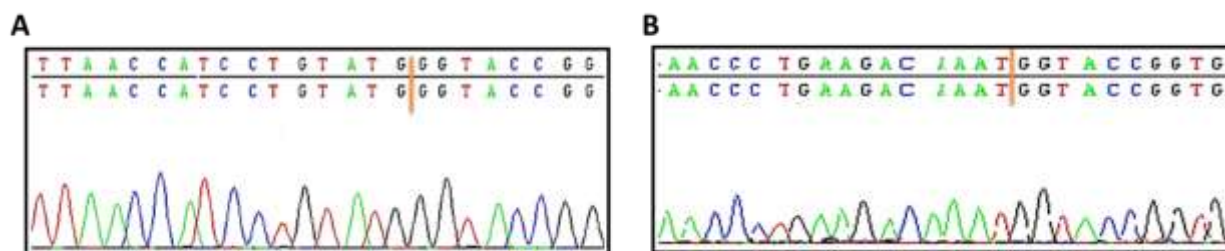


Figura 4.11 Representação de uma região dos eletroferogramas identificativos das isoformas (A) NM_000621.4 e (B) NM_001165947.2 do gene *HTR2A* no cDNA sintetizado a partir do RNA das plaquetas. Reta laranja - *exon-exon boundary*.

Os resultados correspondentes à análise da variação de sequência rs3125 em cada isoforma do gene *HTR2A* nas plaquetas, por sequenciação e PCR-RFLP, estão descritos na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 Análise da variação de sequência rs3125 no DNA genómico (DNAg) e nas isoformas do gene *HTR2A* nas plaquetas de mulheres com diagnóstico provável de vcDFT (1 até 6) e saudáveis (7 até 16).

Material	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
DNAg	GG	GG	GG	GG	GC	GC	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GC	GC	GC	GC
NM_000621.4	G	G	G	G	GC	C	G	G	G	G	G	G	GC	GC	GC	GC
NM_001165947.2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	GC	GC

Nas mulheres doentes e saudáveis, portadoras do genótipo *wild type* (GG: 1 - 4 e 7 - 12 respetivamente), foi identificada expressão monoalélica G em ambas as isoformas (Tabela 4.9). Das mulheres doentes heterozigóticas (GC: 5 e 6), somente a 5 demonstrou expressão bialélica e na isoforma NM_000621.4, uma vez que na NM_001165947.2 foi identificado apenas o alelo G (Tabela 4.9). Por sua vez, na doente 6 foi detetada expressão monoalélica em ambas as isoformas: C na NM_000621.4 e G na NM_001165947.2 (Tabela 4.9). Todas as mulheres saudáveis heterozigóticas (GC: 13 - 16) expressaram ambos os alelos no transcrito NM_000621.4 (Tabela 4.9). No entanto, na isoforma NM_001165947.2, a expressão bialélica foi mantida apenas em 50% (15 e 16), dado que nas restantes mulheres foi identificado somente o alelo G (Tabela 4.9).

4.3.4. Seleção dos genes de referência

Na Figura 4.12 está representada a estabilidade média atribuída pelo programa *geNorm* a cada gene de referência testado no cDNA das plaquetas. Os genes de referência *HPRT1* e *18S* foram utilizados para a normalização da quantificação dos transcritos do gene *HTR2A*, conforme sugerido pelo *geNorm* (Figura 4.12).

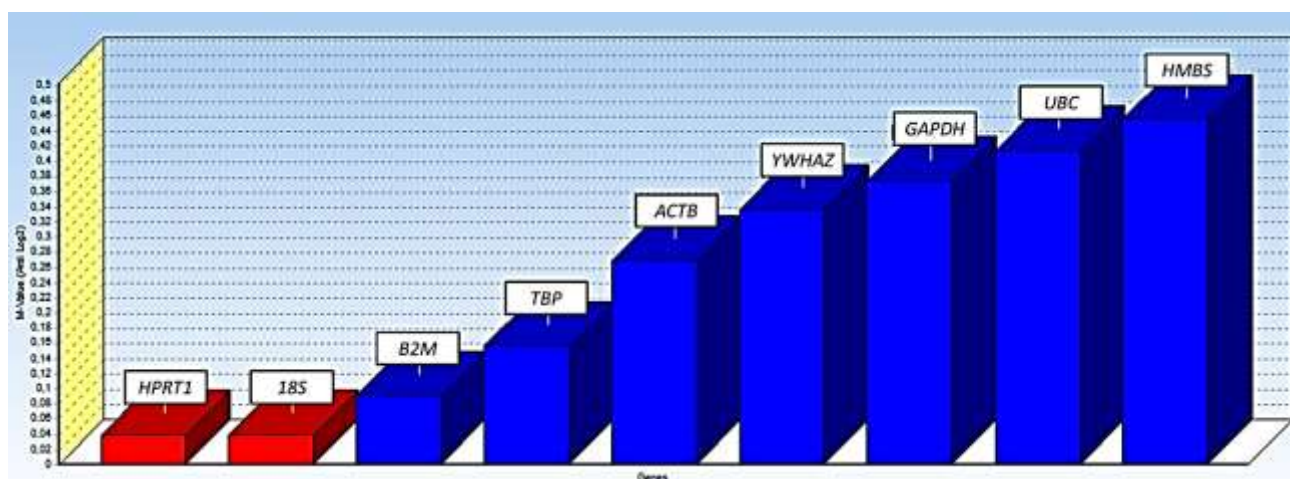


Figura 4.12 Estabilidade média da expressão dos genes endógenos testados no cDNA das plaquetas atribuída pelo programa *geNorm*.

4.3.5. Quantificação relativa de isoformas do gene *HTR2A* por PCR em tempo real

Os transcritos do gene *HTR2A* foram quantificados nas plaquetas por qRT-PCR.

A expressão relativa da isoforma NM_000621.4 do gene *HTR2A*, em plaquetas, nos grupos totais de mulheres com diagnóstico provável de vcDFT e saudáveis, bem como de acordo com a respetiva expressão alélica da variação de sequência rs3125 (Tabela 4.9), estão representadas na Figura 4.13.

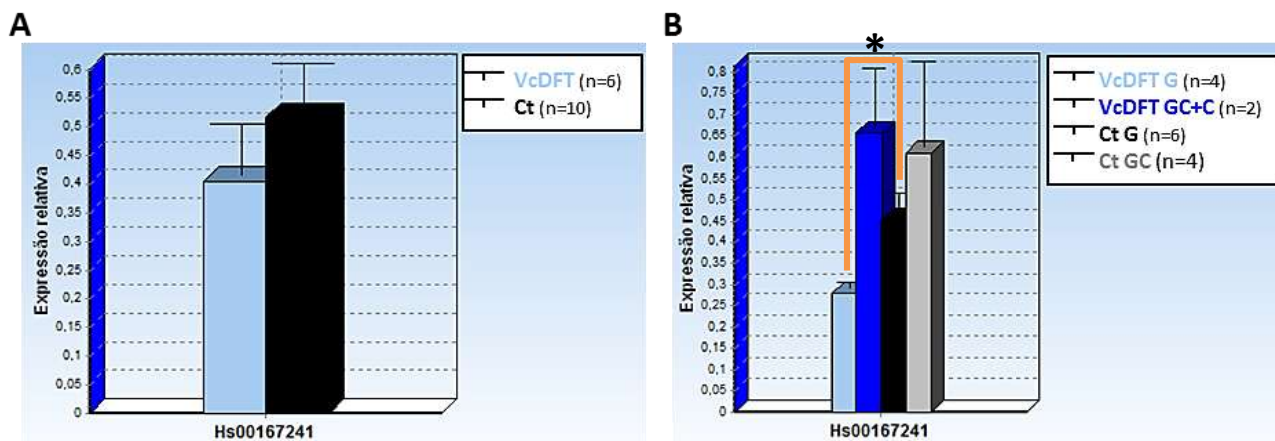


Figura 4.13 Representação gráfica da expressão relativa da isoforma NM_000621.4 do gene *HTR2A*, em plaquetas, nos (A) grupos totais de mulheres com diagnóstico provável de vcDFT e saudáveis e (B) de acordo com a respectiva expressão alélica da variação de sequência rs3125. Resultados expressos como a média \pm SEM (*standard error of the mean*). * Valor estatisticamente significativo: $p=0,025$.

A expressão relativa da isoforma NM_000621.4 foi inferior nas mulheres com diagnóstico provável de vcDFT comparativamente às saudáveis (Figura 4.13A). Contudo, não foi atingida significância estatística ($p=0,398$). Os níveis de expressão relativa deste transcrito no subgrupo de mulheres doentes com expressão monoalélica G para a variação de sequência rs3125 foram inferiores ao das mulheres saudáveis G (Figura 4.13B), tendo sido obtido uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,025$). Os resultados sugerem que a expressão relativa do transcrito NM_000621.4 nas mulheres doentes GC+C é superior comparativamente ao subgrupo de doentes G, bem como em relação ao subgrupo de mulheres saudáveis GC (Figura 4.13B). Contudo, devido ao reduzido número de amostras, não foi possível efetuar a respectiva análise estatística. Apesar da expressão relativa deste transcrito ser inferior nas mulheres saudáveis com expressão monoalélica G, comparativamente às do subgrupo GC (Figura 4.13B), não foi atingida significância estatística ($p=0,915$).

A expressão relativa da isoforma NM_001165947.2 do gene *HTR2A*, em plaquetas, nos grupos totais de mulheres com diagnóstico provável de vcDFT e saudáveis, bem como de acordo com a respectiva expressão alélica da variação de sequência rs3125 (Tabela 4.9), estão representadas na Figura 4.14.

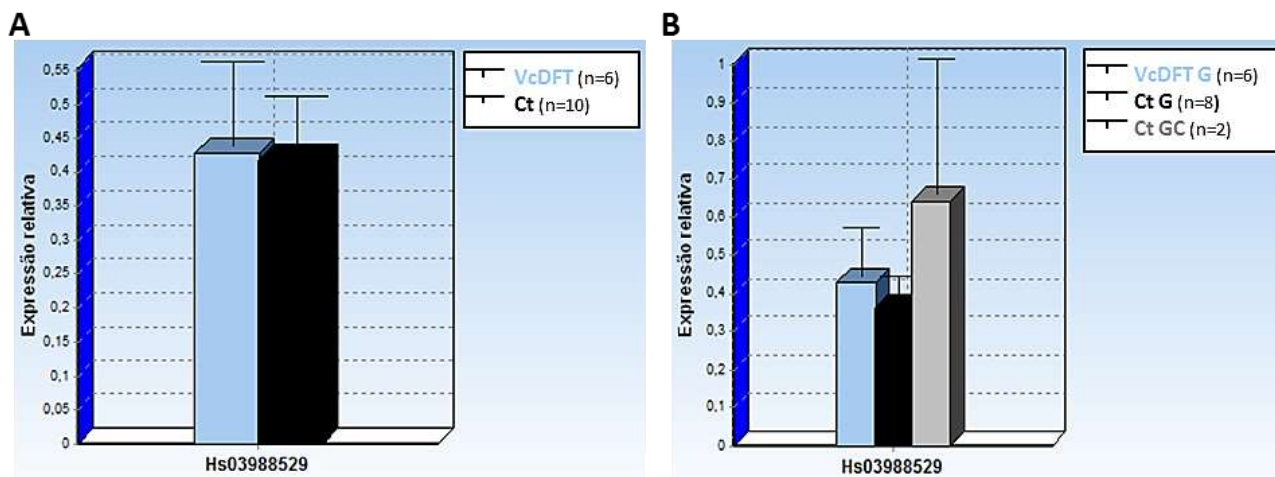


Figura 4.14 Representação gráfica da expressão relativa da isoforma NM_001165947.2 do gene *HTR2A*, em plaquetas, nos (A) grupos totais de mulheres com diagnóstico provável de vcDFT e saudáveis e (B) de acordo com a respectiva expressão alélica da variação de sequência rs3125. Resultados expressos como a média ± SEM (*standard error of the mean*).

A expressão relativa nas plaquetas da isoforma NM_001165947.2 nas mulheres com diagnóstico provável de vcDFT foi aproximada à das mulheres saudáveis (Figura 4.14A), não sendo atingida significância estatística ($p=0,871$). Foram igualmente observados níveis aproximados de expressão relativa deste transcrito nos subgrupos de mulheres doentes e saudáveis com expressão monoalélica G para a variação de sequência rs3125 (Figura 4.14B, $p=0,631$). Os resultados sugerem que os níveis da isoforma NM_001165947.2 nas mulheres saudáveis que expressam os dois alelos (GC) são superiores, comparativamente às que pertencem ao subgrupo com expressão monoalélica G (Figura 4.14B). Contudo, o reduzido número de amostras impossibilitou a análise estatística.

A expressão relativa do transcrito NM_000621.4, comparativamente ao NM_001165947.2, nas mulheres doentes foi de 7,9 vezes superior, enquanto nas mulheres saudáveis o valor foi de 4,4. Por sua vez, nos subgrupos com expressão monoalélica G para a variação de sequência rs3125, os valores obtidos foram de 5,9 e 4,7 respectivamente.

A expressão relativa das duas isoformas do gene *HTR2A*, em plaquetas, determinadas num único ensaio nos grupos totais de mulheres com diagnóstico provável de vcDFT e nas saudáveis, bem como de acordo com os genótipos para o rs3125 (Tabela 4.9), estão representadas na Figura 4.15.

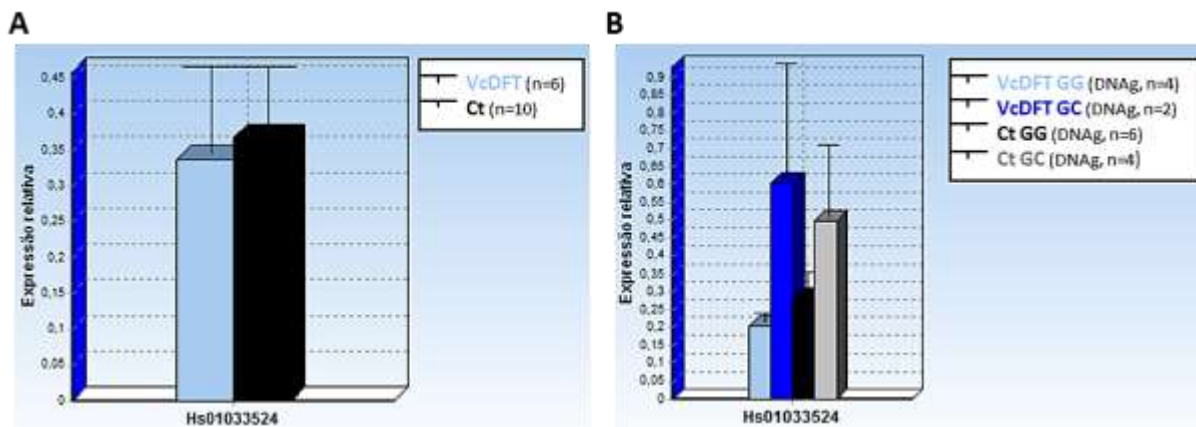


Figura 4.15 Representação gráfica da expressão relativa das duas isoformas do gene *HTR2A*, em plaquetas, nos (A) grupos totais de mulheres com diagnóstico provável de vcDFT e saudáveis e (B) de acordo com os respectivos genótipos para a variação de sequência rs3125. Resultados expressos como a média ± SEM (*standard error of the mean*).

Não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas na expressão relativa das duas isoformas entre os grupos totais de mulheres com diagnóstico provável de vcDFT e saudáveis ($p=0,786$). Embora a expressão relativa das duas isoformas nas mulheres doentes portadoras do genótipo GG seja inferior, comparativamente às mulheres saudáveis GG (Figura 4.15B), não foi atingida significância estatística ($p=0,456$). A expressão relativa no subgrupo de mulheres doentes GC é superior comparativamente ao subgrupo de doentes GG, bem como em relação ao subgrupo de mulheres saudáveis heterozigóticas (GC) (Figura 4.15B). Contudo, o reduzido número de amostras impossibilitou a respetiva análise estatística. Apesar da expressão relativa das duas isoformas ser inferior nas mulheres saudáveis GG, comparativamente às do subgrupo GC (Figura 4.15B), não foi atingida significância estatística (0,456).

A presença das isoformas do gene *HTR2A* no cDNA sintetizado a partir do RNA extraído das PBMCs foi igualmente averiguada por qRT-PCR. Na Tabela 4.10 estão representados os valores de C_T obtidos na quantificação dos transcritos do gene *HTR2A* e de dois genes endógenos, *HPRT1* e *18S*, numa mulher com diagnóstico provável de vcDFT e uma saudável.

Análise do gene *HTR2A* na Degenerescência Lobar Frontotemporal

Tabela 4.10 Análise da expressão nas PBMCs das isoformas do gene *HTR2A* e de dois genes endógenos (*HPRT1* e *18S*) numa mulher com diagnóstico provável de vcDFT e uma saudável (Ct).

Amostra	NM_000621.4 (C _T)	NM_001165947.2 (C _T)	NM_000621.4 + NM_001165947.2 (C _T)	<i>HPRT1</i> (C _T)	<i>18S</i> (C _T)
VcDFT	38,9	Não houve amplificação	40,8	23,6	5,1
Ct	34,9	38,2	37,9	23,9	5,4

Abreviaturas: VcDFT - variante comportamental da Demência Frontotemporal e C_T - *threshold cycle*.

Os resultados sugerem uma amplificação adequada dos genes endógenos *HPRT1* e *18S* e a presença de quantidades vestigiais ou inexistentes dos transcritos do gene *HTR2A* (Tabela 4.10).

5. Discussão

5.1. Análise do gene *HTR2A* em doentes com diagnóstico provável de Degenerescência Lobar Frontotemporal e correlação genótipo - fenótipo

Apesar dos avanços significativos na compreensão da DLFT, desconhecem-se as mutações envolvidas em 30% dos doentes que manifestam uma história familiar positiva e a maioria dos casos esporádicos permanecem inexplicados (See *et al.*, 2010; Schlachetzki, 2011). Adicionalmente, até ao momento, os mecanismos subjacentes à doença ainda não estão completamente compreendidos e são inexistentes tratamentos eficazes (Schlachetzki, 2011). Deste modo, a identificação de genes adicionais envolvidos na DLFT poderá contribuir para a compreensão dos mecanismos subjacentes à doença e para o desenvolvimento de aplicações terapêuticas e de diagnóstico. As variações de sequência identificadas no gene *HTR2A* (Tabela 4.1) não aparentam constituir uma causa primária para a etiologia da DLFT. A amplificação de uma região no intrão do gene *TSPAN9* no doente que aparentava ser portador da deleção rs71790269 em heterozigotia pode ser devida a variações de sequência que favoreceram a hibridização inespecífica do *primer*, porém ausentes nos restantes doentes. Esta situação evidencia claramente a necessidade de, sempre que possível, confirmar os resultados com o intuito de garantir a sua precisão e rigor, evitando ambiguidades científicas. Contudo, a DLFT é uma patologia complexa e multifatorial, na qual vários genes estão envolvidos na suscetibilidade para a doença, sendo, por conseguinte, improvável que uma única mutação num gene cause a patologia. A hipótese de “doença comum - variante comum” sustenta que doenças complexas comuns são em grande parte devidas a variantes genéticas também comuns, com frequências relativamente elevadas na população, sendo o efeito predisponente de cada uma pequeno a modesto (Lander, 1996; Cargill *et al.*, 1999; Chakravarti, 1999). O conjunto das variações genéticas aumentam significativamente o risco para a doença mas, não são, na realidade, propriamente necessárias ou suficientes para a causar (van der Flier & Scheltens, 2005). Pelo contrário, estes genes de risco exibem padrões intrincados de interação uns com os outros e com variáveis não genéticas que modificam o risco para sofrer a doença (van der Flier & Scheltens, 2005). O estudo realizado por Yang *et al.* (2005) verificou que são necessários aproximadamente 20 genes de suscetibilidade para explicar 50% de uma doença complexa comum na população, se os genótipos predisponentes forem comuns. Até ao momento, não há evidência empírica suficiente para provar ou não a referida hipótese. Contudo, alguns exemplos de tais variações comuns são conhecidas, como é o caso dos polimorfismos c.*276C>T e c.894T>G, nos genes *NOS1* e *NOS3* respetivamente,

constituírem fatores de risco para o desenvolvimento da DLFT (Venturelli *et al.*, 2008; Venturelli *et al.*, 2009). Deste modo, no sentido de determinar se algumas das variações de sequência identificadas no gene *HTR2A* desempenham um papel na suscetibilidade para a DLFT, as distribuições genotípicas tinham de ser comparadas considerando as subdivisões de género, idade de início, presença ou ausência de história familiar, depressão e agressividade, MMSE e CDR. Além disso, sabendo que a frequência das variações de sequência pode variar bastante entre as populações (Jorde, 2001; Sanders-Bush *et al.*, 2003), as distribuições genotípicas tinham igualmente de ser analisadas num grupo constituído por indivíduos saudáveis [ajustados relativamente ao género, idade e etnia, recrutados na mesma região geográfica e não relacionados (Risch, 2000; Bird *et al.*, 2001; Correia, 2008)] e comparadas com as distribuições genotípicas e alélicas determinadas no grupo de doentes com DLFT, considerando o número total de amostras analisadas e as subdivisões de género e idade. Diferenças estatisticamente significativas nas frequências entre os subgrupos comparados sugerem o envolvimento do marcador na suscetibilidade para a doença (Risch, 2000; Lewis & Knight, 2012). No estudo de correlação genótipo - fenótipo do presente trabalho, foram selecionadas as variações de sequência *missense* rs6312, rs1805055 e rs6314. De facto, de todas as variações de sequência identificadas em genes associadas com doenças, as *missense/nonsense* (58,9%) são três a seis vezes mais frequentes do que as deleções (21,8%) e as de *splicing* (9,8%) respetivamente (Pasternak, 2005). Adicionalmente, no caso dos GPCRs, tal como o 5-HTR_{2A}, as variações de sequência que alteram o aminoácido codificado podem ter uma consequência deletéria no *folding* da proteína, produzindo uma conformação instável que é retida no retículo endoplasmático, podem modificar as interações entre recetor - ligando e, quando localizadas nos domínios intracelulares, alterar a cinética de interação entre recetor - proteína G ou a fosforilação (Sanders-Bush *et al.*, 2003). Cada uma destas situações resultaria na diminuição do sinal *downstream*, conduzindo à alteração, provavelmente inapropriada, da resposta celular ao estímulo (Sanders-Bush *et al.*, 2003). A variação de sequência rs6312 resulta na substituição do aminoácido asparagina pelo aspartato na posição 49 (p.Asn49Asp) na proteína NP_001159419. A asparagina possui um grupo amino em substituição de um dos átomos de oxigénio existentes no aspartato concomitante com a perda de uma carga negativa (Betts & Russell, 2003). A rs1805055, descrita pela primeira vez por Erdmann *et al.* (1996), promove a substituição do aminoácido treonina por asparagina (p.Thr25Asn), ambos polares, no terminal amínico da proteína NP_000612 (Betts & Russell, 2003). A rs6314, igualmente descrita por Erdmann *et al.* (1996), resulta em diferenças de cargas, uma vez que uma

histidina básica é substituída por uma tirosina neutra, e na possibilidade de fosforilação pelas proteínas cinases, tornando exequível a ocorrência de alterações na estrutura secundária do recetor (Betts & Russell, 2003). As variações de sequência localizadas no promotor (rs6311, rs6315 e rs6316 em ambas as isoformas), na 5'UTR (rs6312, rs6310, rs7996679 e rs36212789 na NM_000621.4) e na 3'UTR (rs58145637 e rs3125 em ambas as isoformas) do gene *HTR2A* foram igualmente selecionadas para o estudo de correlação genótipo - fenótipo, pois podem influenciar a expressão do recetor, de acordo com estudos previamente publicados (Rana *et al.*, 2001; Sanders-Bush *et al.*, 2003). De facto, os níveis de expressão dos GPCRs são importantes na determinação da magnitude e sensibilidade da resposta a agonistas (Rana *et al.*, 2001; Sanders-Bush *et al.*, 2003). Além disso, variações genéticas no promotor e nas regiões não traduzidas estão associadas ou conferem suscetibilidade para várias doenças humanas (Rana *et al.*, 2001; Sanders-Bush *et al.*, 2003; Chatterjee *et al.*, 2010; Pal *et al.*, 2010). Finalmente, a variação de sequência silenciosa rs6313 foi selecionada porque tem sido proposto o seu envolvimento em várias patologias, tais como a DA (Holmes *et al.*, 1998; Nacmias *et al.*, 2001; Holmes *et al.*, 2003; Rocchi *et al.*, 2003; Assal *et al.*, 2004; Lam *et al.*, 2004) ou a esquizofrenia (Inayama *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1996; Abdolmaleky *et al.*, 2004). Além disso, supõe-se que os codões sinónimos das variações de sequência silenciosas podem promover cinéticas de tradução diferentes e, por conseguinte, modificar o *folding* concomitante com a produção de uma proteína com estrutura ou função final diferente (Komar, 2007; Waldman *et al.*, 2011).

No estudo de correlação genótipo - fenótipo foram identificados valores estatisticamente significativos na comparação de frequências genótípicas e alélicas correspondentes à variação de sequência rs3125 entre as mulheres com diagnóstico provável de vcDFT e mulheres saudáveis ($p=0,047$ e $0,037$ respetivamente, Tabela 4.8). Uma vez que foi verificada significância estatística apenas relativamente ao género feminino, a variação de sequência rs3125 poderá estar relacionada com a manifestação da doença em sinergia com outros fatores ainda desconhecidos, que conferem maior predisposição para a patologia nas mulheres. Williams *et al.* (2003) verificaram que os efeitos de polimorfismos em genes relacionados com a 5-HT na função serotoninérgica no SNC variam em função do género. Por conseguinte, concluíram que o género tem de ser incluído na investigação dos efeitos dos referidos polimorfismos. De facto, a associação entre o rs3125 e a vcDFT não teria sido identificada no presente estudo se o género não tivesse sido considerado. Vários estudos têm determinado dimorfismos sexuais no sistema serotoninérgico que podem contribuir para a vulnerabilidade para a vcDFT nas mulheres: a velocidade média de síntese de 5-HT nos homens

normais é 52% superior à das mulheres em várias regiões cerebrais (Nishizawa *et al.*, 1997); as concentrações do metabolito 5-HIAA no CSF são maiores nas mulheres do que nos homens (Jönsson *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2003); a atividade da MAO é significativamente superior nas mulheres, comparativamente aos homens, em várias regiões cerebrais (Robinson *et al.*, 1977); os potenciais de ligação do 5-HTT, um transportador de 5-HT, são menores nas mulheres, em comparação com os homens, em várias regiões cerebrais corticais e subcorticais (Jovanovic *et al.*, 2008). Adicionalmente, sustenta-se a hipótese da associação de alguns processos patológicos e doenças neurodegenerativas com as mulheres ser devida ao declínio nos níveis de estrogénio na menopausa (Diel, 2002; Cutter *et al.*, 2003). No cérebro, os estrogénios e o sistema serotoninérgico estão envolvidos na regulação do humor e de funções comportamentais, tais como a aprendizagem e a memória (Rubinow *et al.*, 1998; Rybaczyk *et al.*, 2005; Birzniece *et al.*, 2006; Hildebrandt *et al.*, 2010). Supõe-se que o declínio de estrogénios nas mulheres reduz a disponibilidade de 5-HT na fenda sinática, favorece o efeito inibitório do 5-HTR_{1A} e diminui os níveis de RNAm do 5-HTR_{2A} (Rybaczyk *et al.*, 2005; Hildebrandt *et al.*, 2010). Há estudos que têm demonstrado que não há alteração nos níveis de estrogénios nos homens devido à conversão da testosterona em estrogénio no cérebro (Swerdlhoff & Wang, 1993; Sternbach, 1998; Black *et al.*, 2001), sendo improvável uma alteração acentuada nos níveis de 5-HTR_{2A} nos homens. As diferenças entre os géneros também se estendem a funções cognitivas. Perneczky *et al.* (2007) verificaram que teriam de ocorrer mais lesões cerebrais nos homens com DLFT do que nas mulheres para causar o mesmo grau de défice cognitivo. Segundo estes investigadores, os homens têm maior reserva cognitiva e, por conseguinte, o grau de compensação das lesões cerebrais é superior, comparativamente às mulheres. A forma como as referidas diferenças entre os géneros se combinam para promover vulnerabilidade para a vcDFT nas mulheres não é clara, mas a sua consistência é indubitavelmente sugestiva. A variação de sequência rs3125 localiza-se na 3'UTR que, por sua vez, está envolvida na regulação da expressão (Pesole *et al.*, 2000; Mignone *et al.*, 2002; Barrett *et al.*, 2012). Variações de sequência que alteram os elementos funcionais da 3'UTR, tais como o sinal de poliadenilação, locais de ligação de microRNAs (miRNAs), elementos ricos em AU, podem afetar a expressão do gene e conduzir à produção de proteínas não funcionais ou quantidades reduzidas de peptídeos funcionais (Pal *et al.*, 2010; Barrett *et al.*, 2012; Matoulkova *et al.*, 2012). De facto, as sequências regulatórias ativas na 3'UTR (elementos *cis* ou *cis-acting*) são considerados como marcas moleculares reconhecidas pelos elementos *trans-acting*, tais como os miRNAs, para ativarem ou reprimirem a expressão de um gene (Matoulkova *et al.*, 2012).

Os miRNAs regulam a expressão ao nível pós - transcricional pela destabilização/degradação do RNAm e/ou inibição da tradução (Pal *et al.* 2010; Barrett *et al.*, 2012; Jun & Mouradian, 2012; Matoulkova *et al.* 2012; Ziebarth *et al.*, 2012). Estima-se que regulam aproximadamente 60% dos genes humanos (Ziebarth *et al.*, 2012). Variações genéticas no local de ligação do miRNA podem eliminá-lo ou enfraquecê-lo, bem como, gerar um ilegítimo, resultando na alteração dos níveis de expressão do gene e influenciando o risco para a doença (Pal *et al.*, 2010; Ziebarth *et al.*, 2012). Rademakers *et al.* (2008) sugeriram que a regulação por miRNAs pode representar um mecanismo comum subjacente a doenças neurodegenerativas complexas. Estes investigadores verificaram que os doentes homozigóticos TT para o rs5848 (localizado na 3'UTR do gene *GRN*) têm 3,2 vezes mais o risco de desenvolver DLFT-U e que o miR-659 liga-se de forma mais eficiente ao alelo T resultando na inibição da tradução da proteína GRN. Assim, a variação de sequência rs3125 pode promover alterações nos níveis de RNAm ou da proteína do 5-HTR_{2A} nas mulheres com diagnóstico provável de vcDFT portadoras do genótipo GG por mecanismos ainda desconhecidos envolvendo miRNAs, que, juntamente com os efeitos dos dimorfismos sexuais, poderão justificar a associação obtida. Deste modo, é revelante quantificar a expressão do gene *HTR2A* nas mulheres com diagnóstico provável de vcDFT comparativamente às mulheres saudáveis, de acordo com os genótipos para o rs3125.

Os resultados obtidos indicam uma associação entre as variações de sequência rs6312 e rs6310 (Tabela 4.4), hipótese sustentada pelo facto das frequências genotípicas e alélicas existentes na população europeia serem iguais (rs6312/rs6310: AA - 0,885; AG - 0,115; GG - 0; A - 0,942; A - 0,942; Sherry *et al.*, 2001). Adicionalmente, os resultados sugeriram que a variação de sequência rs6311 está em desequilíbrio de ligação com a rs6313 (Tabela 4.4), associação igualmente identificada noutros estudos (Spurlock *et al.*, 1998; Saiz *et al.*, 2008). Somente um indivíduo saudável foi exceção, situação também observada por Mandelli *et al.* (2011) cujas distribuições genotípicas foram: 19 indivíduos saudáveis portadores do genótipo AA, 32 do AG e 14 do GG no caso do rs6311 e 14 portadores do CC, 31 do TC e 20 do TT para o rs6313. O desequilíbrio de ligação entre alelos comuns pode ser particularmente relevante na identificação de genes de predisposição para doenças (Reich *et al.*, 2001). Contudo, neste caso, o referido desequilíbrio de ligação não aparenta estar associado com a patologia, uma vez que foi igualmente identificado em indivíduos saudáveis.

5.2. Estudo de genómica funcional da variação de sequência rs3125

Variações de sequência que estão envolvidas na regulação da expressão de um gene podem contribuir para a suscetibilidade de doenças humanas (Pastinen *et al.*, 2004; Pastinen *et al.*, 2006). Contudo, uma limitação inerente aos estudos de expressão de genes em doenças neurológicas como a DLFT é a obtenção de tecido cerebral *pós-mortem*. No sentido de contornar este problema, são frequentemente utilizados modelos periféricos facilmente acessíveis e menos invasivos, obtidos a partir dos doentes vivos. Tendo em conta que o sistema serotoninérgico pode estar implicado na etiologia de uma variedade de doenças neurológicas, a possibilidade de ser estudado em células de fácil acesso pode contribuir para a compreensão dessas patologias. Por exemplo, Muck-Seler *et al.* (2009) verificaram que a diminuição na concentração de 5-HT e na atividade da MAO-B nas plaquetas estava associada com a DA na fase tardia, sugerindo a possibilidade destes marcadores indicarem a gravidade e/ou o progresso clínico da patologia. As plaquetas foram usadas no presente estudo para analisar o possível papel funcional desempenhado pela variação de sequência rs3125 nas mulheres com diagnóstico provável de vcDFT. De facto, as plaquetas têm sido utilizadas como um modelo periférico acessível e rápido do neurónio serotoninérgico: a 5-HT é armazenada para ser protegida da ação da enzima MAO em ambos os tecidos (Jernej *et al.*, 2000); possuem os recetores 5-HTR_{2A}, cuja função é farmacologicamente similar aos existentes no SNC (Stahl, 1985; Pletscher, 1988; Singh *et al.*, 2003); a sequência nucleotídica do cDNA do gene *HTR2A* nas plaquetas é idêntica ao do córtex frontal humano (Cook *et al.*, 1994); a estimulação dos recetores 5-HTR_{2A} nas plaquetas promove a hidrólise dos fosfoinositídeos, produzindo IP3 concomitante com a mobilização de Ca²⁺ intracelular a partir dos locais de armazenamento internos, tal como no cérebro (Affolter *et al.*, 1984; de Chaffoy de Courcelles *et al.*, 1985; Suzuki *et al.*, 2001); as características de ligação dos ligandos ao 5-HTR_{2A} nas plaquetas e no córtex frontal são similares (Geaney *et al.*, 1984; Elliott & Kent, 1989; Ostrowitzki *et al.*, 1993). Além disso, as plaquetas armazenam e libertam neurotransmissores, tais como o glutamato e a dopamina (Kroll & Schafer, 1989; Cupello *et al.*, 2005), bem como algumas proteínas relacionadas com os neurónios, por exemplo recetores (Catricala *et al.*, 2012). A isoenzima *neuron-specific enolase* (NSE), expressa apenas em neurónios e células neuroendócrinas específicas, foi identificada nos megacariócitos e nas plaquetas sanguíneas (Marangos *et al.*, 1980).

Neste estudo verificou-se que as plaquetas possuem uma quantidade reduzida de RNA (Secção 4.3.1.), resultado concordante com os dados na literatura (Harrison & Goodall, 2008; Schedel

& Rolf, 2009). Por exemplo, Sottile *et al.* (1989) obtiveram apenas 20ng de RNA a partir de 10^7 plaquetas, enquanto Schedel & Rolf (2009) entre 50 - 100ng a partir de $3 - 5 \times 10^8$ células. Devido à concentração reduzida de RNA nas plaquetas, não foi obtida qualquer informação na análise realizada no *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Secção 4.3.1.). É de referir que a maioria dos estudos realizados não determinam a qualidade e a integridade do RNA das plaquetas (Wang *et al.*, 2003; Graham *et al.*, 2004; Birschmann *et al.*, 2008; Shashkin *et al.*, 2008), apesar da sua importância. Neste estudo, seria interessante determinar a qualidade e a integridade do RNA das plaquetas tal como foi realizado por Calverley *et al.* (2010), nomeadamente utilizando o *RNA 6000 Pico Kit* (Agilent Technologies) que compreende o intervalo de concentração de RNA entre 500 e 5000pg/ μ L (Agilent Technologies, 2006). Contudo, a integridade e a qualidade de cada isoforma do gene *HTR2A* foi assegurada pela sequenciação dos respetivos fragmentos de cDNA amplificados de aproximadamente 1,3Kb e que incluíam *exon-exon boundaries* (Secção 3.2.3.5.). De facto, Rolf *et al.* (2005) verificaram que é possível efetuar uma análise de RNA a partir de aproximadamente 8×10^8 plaquetas, valor inferior ao que foi usado no presente estudo. Devido à quantidade reduzida de RNAm existente nas plaquetas, comparativamente a outras células e ao facto da transcrição ocorrer no núcleo das células eucarióticas, a sua importância foi subestimada durante muito tempo e considerado que estas células anucleadas tinham uma capacidade limitada ou inexistente de biossíntese de proteínas (Harrison & Goodall, 2008). Surpreendentemente foi constatado que as plaquetas possuem: RNAs mensageiros (RNAsm) ricos em caudas de poli(A), que protegem o RNA da degradação e são necessárias para a realização da tradução (Roth *et al.*, 1989); a proteína eucariótica eIF4E (fator de iniciação 4), essencial para a tradução é constitutivamente expressa (Lindemann *et al.*, 2001); retículo endoplasmático rugoso e ribossomas (Ts'ao, 1971; Harrison & Goodall, 2008); RNAsm não processados e um spliceossoma funcional, complexo necessário para a remoção dos intrões de modo a que o RNAm maduro possa ser traduzido (Denis *et al.*, 2005). Estas evidências de controlo pós-transcricional da expressão de um gene nas plaquetas demonstra que são células complexas e que o *pool* de RNAm é estável, não degradado e mais diversificado do que se pensava anteriormente, sendo sugerida uma síntese regulada e induzida de várias proteínas (Pabla *et al.*, 1999; Gnatenko *et al.*, 2003; McRedmond *et al.*, 2004; Macaulay *et al.*, 2005; Harrison & Goodall, 2008). De facto, estão representados nas plaquetas 15 - 32% de genes codificantes de proteínas na forma de RNAm (Bugert *et al.*, 2003; Gnatenko *et al.*, 2003; McRedmond *et al.*, 2004). Contudo, a literatura refere que a identificação de RNA específico das plaquetas é muitas vezes limitada pela

contaminação com RNA proveniente de leucócitos, cujas quantidades são superiores (Birschmann *et al.*, 2008; Schedel & Rolf, 2009). Por exemplo, Sottile *et al.* (1989) obteve 20ng de RNA total a partir de 10^7 plaquetas comparativamente a 1,2g no mesmo número de linfócitos (10^7). Portanto, um pequeno número de leucócitos pode significativamente distorcer o perfil de RNAm das plaquetas (Rolf *et al.*, 2005; Schedel & Rolf, 2009). No entanto, neste estudo a possibilidade de contaminação com leucócitos foi minimizada através da realização de uma centrifugação para a sua remoção dos preparados de plaquetas (Secção 3.2.3.1.), bem como através da determinação da presença de DNAg, cuja possível fonte seria a partir de células nucleadas, tais como os linfócitos ou monócitos.

Das mulheres doentes (5 e 6) e saudáveis (13 - 16) heterozigóticas para a variação de sequência rs3125, apenas na doente 6 não se encontrou expressão bialélica no transcrito NM_000621.4 do gene *HTR2A*, pois o alelo C foi o único detetado (Tabela 4.9). No entanto, na isoforma NM_001165947.2, foi identificada expressão bialélica apenas em 50% das mulheres saudáveis (15 e 16), o alelo G foi o único detetado nos restantes indivíduos incluídos na amostragem (Tabela 4.9). Supõe-se que no ambiente celular, na ausência de elementos *cis - acting*, os alelos são igualmente expressos (Yan, 2005). Por sua vez, quando um indivíduo é heterozigótico para polimorfismos *cis - acting*, o RNAm de cada alelo é expresso de forma diferente (Yan, 2005). Lo *et al.* (2003) avaliaram a expressão alélica do rs3125 genotipado em heterozigotia e verificaram que a razão C/G era bialélica no rim (1,06) e monoalélica no fígado (16,46). Zhang *et al.* (2009) sugeriram que a expressão por alelo está associada a uma regulação *cis* específica por tecido. Pastinen *et al.* (2004) analisaram, em linhas celulares linfoblastóides, a variação de sequência rs6313 no gene *HTR2A* em heterozigotia e identificaram uma expressão monoalélica (de qualquer um dos alelos) na isoforma NM_000621. Lo *et al.* (2003) avaliaram 1063 polimorfismos (em 602 genes) em heterozigotia e detetaram a expressão preferencial de um alelo em pelo menos um indivíduo em 54% dos genes analisados. Bray *et al.* (2003) constataram que as influências *cis - acting* na expressão de um gene ocorrem também no córtex cerebral, pois identificaram diferenças na expressão alélica relativa em 7 dos 15 genes analisados. A expressão diferencial dos dois alelos está associada com a variabilidade fenotípica humana e tem sido sugerida a possibilidade de conferir suscetibilidade para algumas doenças (Lo *et al.*, 2003; Pastinen *et al.*, 2004; Ronald *et al.*, 2005; Gimelbrant *et al.*, 2007; Milani *et al.*, 2009). Contudo, no presente estudo, a expressão diferencial dos dois alelos para a variação de sequência rs3125 não aparenta estar associado com a patologia, uma vez que foi igualmente identificada em indivíduos saudáveis. Contudo, seria necessário obter mais amostras

heterozigóticas de doentes e indivíduos saudáveis e determinar a respetiva expressão alélica para o rs3125 nas isoformas do gene *HTR2A* para averiguar a possível associação com a patologia.

A quantificação relativa, por RT-PCR, dos transcritos do gene *HTR2A* em plaquetas, foi realizada incluindo os genes de referência *HPRT1* e *18S*, determinados como os mais estáveis em cada grupo analisado (mulheres doentes e saudáveis) para que, deste modo, fossem controladas variáveis tais como a quantidade de material inicial ou diferenças na eficiência dos ensaios (por exemplo da síntese de cDNA) (Thellin *et al.*, 1999; Bustin, 2000; Vandeschuer *et al.*, 2002; Arya *et al.*, 2005; Kubista *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2006). Até ao momento, apenas o estudo realizado por Zsóri *et al.* (2013) averiguou em 7 indivíduos saudáveis (idades compreendidas entre os 26 - 54 anos) quais os genes mais estáveis a serem incluídos na quantificação de transcritos nas plaquetas. De um painel de 17 genes (*GNAS*, *ACTB*, *HDGF*, *PTMA*, *B2M*, *GAPDH*, *HMBS*, *TBP*, *UBC*, *EAR*, *OAZ1*, *WIPI2*, *NCOA4*, *EEF2*, *VAMP*, *ANAPC5* e *CFL1*), foram indicados os genes *GAPDH*, *GNAS* e *ACTB* (Zsóri *et al.*, 2013). Os resultados no presente estudo sugerem que a expressão do alelo C para a variação de sequência rs3125 promove o aumento da expressão relativa do transcrito NM_000621.4 em ambos os grupos analisados (Figura 4.13B) e do NM_001165947.2 nas mulheres saudáveis (nenhuma doente expressou o referido alelo neste transcrito, Figura 4.14B). Contudo, o número de mulheres doentes e mulheres saudáveis com expressão do alelo C na isoforma NM_000621.4 (n=2 e 4 respetivamente) e na NM_001165947.2 (n=0 e 2 respetivamente) era muito reduzido. Assim, de forma a elevar o poder estatístico e a confiança nos referidos resultados, seria necessário incluir amostras com expressão bialélica (GC) e monoalélica C em ambos os grupos analisados e para cada isoforma do gene *HTR2A*. Adicionalmente, foi obtida uma diferença estatisticamente significativa na comparação dos níveis de expressão relativa do transcrito NM_000621.4 entre os subgrupos de mulheres doentes e saudáveis com expressão monoalélica G ($p=0,025$). A expressão de um gene é regulada nas células humanas e a sua alteração pode conduzir ao desenvolvimento de doenças (Cheung & Spielman, 2009). O nível de expressão genética é um fenótipo quantitativo diretamente associado com a variação no DNA, podendo ser influenciado por polimorfismos em regiões *cis* - regulatórias, uma vez que afetam a iniciação da transcrição, a velocidade de transcrição e/ou a estabilidade do transcrito de uma forma específica por alelo (Wittkopp *et al.*, 2004; Pastinen *et al.*, 2006; Stranger *et al.*, 2007; Cheung & Spielman, 2009). Stranger *et al.* (2007) supõem a existência de uma abundância de variações *cis* - regulatórias no genoma humano, sendo algumas responsáveis pelo desenvolvimento de suscetibilidade para doenças. Uma das formas de modular a expressão genética é pela

alteração dos locais de ligação de miRNAs (Zhang *et al.*, 2009). Embora o mecanismo através do qual os alvos de RNAm específicos são selecionados não esteja ainda classificado, uma característica dos pares de miRNA - RNAm é a complementariedade entre a extremidade 5' (*seed region*) do miRNA maduro e a 3'UTR do RNAm alvo (Barrett *et al.*, 2012; Jun & Mouradian, 2012; Ziebarth *et al.*, 2012). A previsão obtida para a variação de sequência rs3125 recorrendo à “*PolymiRTS Database 3.0*” (Ziebarth *et al.*, 2012) revelou a possibilidade de ligação de miRNAs diferentes de acordo com o nucleótido presente: hsa-miR-5683 e hsa-miR-5689 no caso do alelo G e hsa-miR-3976 no C (Figura 5.1).

RefSeq ID: [NM_000621](#)
 Gene Symbol: *HTR2A*
 Description: Homo sapiens 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A (*HTR2A*), transcript variant 1, mRNA.
 Gene Location: chr13(-):47407512-47471169

SNPs and indels in miRNA target sites

Location	Mutation ID	Variant type	Wobble base pair	Ancestral Allele	Allele	miR ID	miR Site
47408851	rs3125	snp	N	G	G	hsa-miR-5683	atATCTGTAtgcc
						hsa-miR-5689	atateTGTATGCc
					C	hsa-miR-3976	ataTCTCTATgcc

Figura 5.1 Representação dos miRNAs (miR) que se podem ligar na presença do alelo *wild type* e do variante correspondente à variação de sequência rs3125. Previsão obtida na “*PolymiRTS Database 3.0*”.

Conforme referido anteriormente, por causa da complementariedade miRNA - RNAm, variações genéticas no local de ligação do miRNA pode eliminá-lo ou enfraquecê-lo, bem como, gerar um ilegítimo, resultando na alteração dos níveis de expressão do gene (Pal *et al.*, 2010; Ziebarth *et al.*, 2012). Deste modo, a possível indução da degradação do RNAm da isoforma NM_000621.4 pelo complexo RISC, em consequência da complementariedade entre as sequências do miRNA com o RNAm alvo na presença do alelo G para a variação de sequência rs3125 (Bartel, 2009; Barrett *et al.*, 2012; Jun & Mouradian, 2012), poderá estar envolvida na menor expressão relativa (da NM_000621.4) identificada nas mulheres doentes com expressão monoalélica G comparativamente às mulheres saudáveis G ($p=0,025$), bem como em relação às doentes com expressão do alelo C (na forma bialélica GC e monoalélica C (Figura 4.13B). Os resultados sugerem que o efeito não é tão acentuado entre as mulheres saudáveis com expressão monoalélica G e bialélica (GC) (Figura 4.13B).

Esta hipótese pode ainda ser suportada pelo facto de que vários estudos recentes, surpreendentemente, revelaram que as plaquetas humanas possuem uma quantidade elevada e diversificada de miRNAs funcionais, sugerindo que os RNAsm podem ser regulados por miRNAs (Landry *et al.*, 2009; Edelstein *et al.*, 2011; Nagalla *et al.*, 2011; Osman *et al.*, 2011; Plé *et al.*, 2012). Portanto, a expressão relativa diminuída do transcrito NM_000621.4 nas mulheres doentes com expressão monoalélica G devido ao possível envolvimento de miRNAs, conjugado com a prevalência aumentada do genótipo GG e do alelo G sugerida no estudo de correlação genótipo-fenótipo (Figura 4.8), juntamente com os efeitos derivados de dimorfismos sexuais abordados na Secção 5.1, poderão justificar a associação obtida do rs3125 como um possível fator de risco nas mulheres com diagnóstico provável de vcDFT.

Este estudo possibilitou ainda verificar a importância de analisar a expressão de cada isoforma do gene *HTR2A* separadamente. De facto, conforme mencionado anteriormente, foram identificados indivíduos genotipicamente heterozigóticos que não expressaram ambos os alelos (Tabela 4.9). Tendo conhecimento apenas da informação genotípica e a determinação da expressão total dos dois transcritos do gene *HTR2A* num único ensaio, embora ocorra a diminuição da expressão relativa nas mulheres doentes portadoras do genótipo GG, comparativamente às saudáveis GG (Figura 4.15B), não foi atingida significância estatística (0,456). Portanto, se a expressão específica do transcrito NM_000621.4 não tivesse sido analisada, a significância estatística entre as mulheres doentes e saudáveis com expressão monoalélica G teria sido ignorada ($p=0,025$).

Adicionalmente, foi possível verificar que a expressão da isoforma NM_000621.4 é superior à da NM_001165947.2 nos dois grupos estudados (mulheres doentes e saudáveis). A expressão relativa da NM_000621.4, comparativamente à NM_001165947.2, foi de 4,4 vezes mais no grupo controlo e de 7,9 nos doentes. Mesmo de acordo com a expressão monoalélica G, a expressão relativa da isoforma NM_000621.4 continua a ser superior à NM_001165947.2 em ambos os grupos (4,7 e 5,9 vezes respetivamente). A referida proporção sugere que talvez a isoforma NM_000621.4 seja mais funcional ou transcrita mais rapidamente. Contudo, não temos conhecimento até ao momento de estudos que tenham comparado as características das duas proteínas. Embora os mecanismos básicos pelos quais os polimorfismos *cis-acting* influenciam a expressão de um gene ainda tenham de ser completamente compreendidos, sustenta-se a hipótese que possam atuar na expressão relativa por isoforma (Pastinen *et al.*, 2006).

A expressão do gene *HTR2A* foi também analisada nas PBMCs. Alguns estudos demonstraram uma associação entre os linfócitos e doenças neuropsiquiátricas, tais como a depressão, esquizofrenia e a DA (Maes *et al.*, 1995a; Maes *et al.*, 1995b; Irwin, 1999; Tarkowski *et al.*, 1999; Schwarz *et al.*, 2001a; Schwarz *et al.*, 2001b). Foi sugerido que a auto-imunidade e a inflamação podem fazer parte dos mecanismos patofisiológicos da DLFT, tendo sido detetados níveis elevados de anticorpos para gangliosídeos (Sjögren & Wallin, 2001) e do fator de necrose tumoral - alfa (TNF- α) (Sjögren *et al.*, 2004) no CSF, comparativamente a indivíduos saudáveis, bem como nos níveis de expressão relativa do fator de transcrição SP4 nas PBMCs (Villa *et al.*, 2012). De facto, os linfócitos libertam citoquinas periféricas que podem alterar as funções do SNC de uma forma específica invocando respostas controladas autonómicas, neuroendócrinas e comportamentais (Quan & Herkenham, 2002). A existência de recetores de citoquinas nos neurónios, tais como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, TNF (Sternberg, 1997; Turnbull & Rivier, 1999), sustenta a hipótese de que desempenham uma influência direta na função neuronal. As citoquinas TNF α , IL-10 e IL-3 aparentam estar envolvidas na morte celular e na sobrevivência neuronal (Sternberg, 1997). Por sua vez, o SNC regula o metabolismo dos linfócitos através de hormonas, neurotransmissores e neuropeptídeos (Gladkevich *et al.*, 2004). Tal como as células neuronais, os linfócitos expressam neurotransmissores e os recetores correspondentes, tais como acetilcolina, dopamina ou 5-HT (Gladkevich *et al.*, 2004). A possibilidade dos linfócitos possuírem um sistema de armazenamento serotoninérgico foi sugerido. Existem evidências da presença de um mecanismo de *reuptake* pelo transportador de 5-HT nos linfócitos que possuem características gerais e propriedades farmacológicas similares às encontradas nos tecidos neuronais e nas plaquetas (Faraj *et al.*, 1994).

Apesar da elevada qualidade e integridade do RNA extraído a partir das PBMCs de cada indivíduo constituinte da amostragem, as isoformas do gene *HTR2A* não foram identificados. Em contrapartida, no estudo realizado por Dürk *et al.* (2005) os referidos transcritos foram detetados no RNA extraído com o *RNeasy mini kit* a partir de monócitos humanos. Contudo, o RNA extraído não foi tratado com *DNase* nem a presença de DNAg averiguada, passos cruciais sobretudo quando foram usados *primers* que hibridizavam no mesmo exão (verificado através do *software In-Silico "PCR, UCSC Genome Browser"*, Fujita *et al.*, 2011), não discriminando entre o cDNA e o DNAg. Assim, há a possibilidade de Dürk *et al.* (2005) terem amplificado DNAg em vez dos transcritos do gene *HTR2A*. Yang *et al.* (2006) concluíram que o *HTR2A* é expresso nas PBMCs humanas utilizando o RNA extraído com o *RNeasy mini kit* e os *primers* descritos por Dürk *et al.* (2005). Contudo, mais uma vez, não foi

realizado o tratamento com *DNase* nem averiguada a presença de DNAg. Desta forma, não é excluída a possibilidade de ter sido amplificado DNAg. Nos estudos desenvolvidos por Chon *et al.* (2004) e Guhathakurta *et al.* (2009) foram igualmente utilizados *primers* que hibridizam no mesmo exão em RNA extraído a partir de sangue total de humanos, não sendo novamente averiguada a presença de DNAg nem efetuado o tratamento com *DNase*. No sentido de evitar resultados devidos à amplificação de DNAg, é cada vez mais recomendado na literatura a utilização de *primers* que hibridizem em exões diferentes, possuindo pelo menos um intrão entre eles, ou um *primer* numa *exon-exon boundary* (Bustin, 2000; Ginzinger, 2002; Bustin & Nolan, 2004; Kusbista *et al.*, 2006). Se as *intron-exon boundaries* são desconhecidas ou quando o alvo não tem intrões, é imprescindível tratar a amostra de RNA com *RNase-free DNase* e averiguar a presença de DNAg, por exemplo através da inclusão de um RT⁻ (Bustin, 2000; Ginzinger, 2002; Kubista *et al.*, 2006).

Uma vez que a RT-PCR apresenta elevada sensibilidade, possibilitando a detecção específica de sequências de ácidos nucleicos a partir de quantidades limitadas de amostra, por vezes até menos de 5 cópias do alvo (Bustin, 2000; Bustin & Nolan, 2004; Valasek & Repa, 2005), os transcritos do *HTR2A* foram quantificados nas PBMCs de uma mulher doente e uma saudável, usando os genes endógenos *HPRT1* e *18S* igualmente selecionados nos estudos desenvolvidos por Carlberg *et al.* (2013) e Bas *et al.* (2004) respetivamente. Os resultados indicaram a presença de quantidades vestigiais ou inexistentes das isoformas do *HTR2A*, porém, foi observada a amplificação adequada dos genes endógenos (Tabela 4.10). Apesar de Wang *et al.* (2010) terem analisado o transcrito NM_000621.4 por RT-PCR em leucócitos, não é possível estabelecer qualquer comparação com os resultados do presente estudo, uma vez que não trataram as amostras com *DNase* e nem averiguaram a presença de DNAg, passos cruciais uma vez que os *primers* usados emparelhavam no mesmo exão. Por sua vez, Serebruaný *et al.* (2010) quantificaram o transcrito NM_000621.4 nas PBMCs extraídas de indivíduos saudáveis (idades compreendidas entre os 35 - 65 anos) por RT-PCR utilizando o ensaio igualmente selecionado no presente estudo e que inclui uma *exon-exon boundary* (HS00167241_m1, Tabela 3.7). Estes investigadores obtiveram o valor de C_T correspondente a 36,12, sustentando a ideia da presença de uma quantidade vestigial do transcrito nas PBMCs humanas. Adicionalmente, verificaram que a expressão nas plaquetas (C_T=29,39) era superior, comparativamente às PBMCs (Serebruaný *et al.*, 2010), tal como foi sugerido nos resultados do presente estudo. No entanto, tem sido referido na literatura que a inibição da produção de TNF- α pela 5-HT envolve a participação do recetor 5-HTR_{2A} nas PBMCs estimuladas, promovendo a

diminuição das respostas inflamatórias (Arzt *et al.*, 1991; Cloëz-Tayarani *et al.*, 2003; Kubera *et al.*, 2005). Uma possível explicação para a identificação da presença do 5-HTR_{2A} pode ser devida ao facto de as células vivas terem a capacidade de, numa determinada altura, expressarem alguns genes e outros não (Ma *et al.*, 2006). Portanto, quando uma proteína específica é necessária na célula, o respetivo gene codificante é ativado, correspondendo a primeira etapa à sua transcrição para RNAm (Ma *et al.*, 2006). Geralmente, a quantidade de RNAm produzido correlaciona-se com a quantidade de proteína que é eventualmente sintetizada e necessária (Ma *et al.*, 2006).

5.3. Perspetivas futuras

Seria enriquecedor para este estudo aumentar o número de amostras de DNA correspondentes aos grupos de doentes com diagnóstico provável de DLFT e controlo de forma a aumentar o poder estatístico.

O estudo funcional do rs3125 seria complementado pela quantificação das proteínas codificadas pelos transcritos NM_000621.4 e NM_001165947.2 nas mulheres analisadas com diagnóstico provável de vcDFT e saudáveis. Essa determinação poderia ser realizada por *Western blot*, a técnica convencional para este tipo de análise (Dale & von Schantz, 2002). A possibilidade dos miRNAs hsa-miR-5683 e hsa-miR-5689 (Figura 5.1) promoverem alterações nos níveis do transcrito NM_000621.4 deveria ser averiguada, seguindo por exemplo o procedimento descrito por Rademakers *et al.* (2008). Adicionalmente, seria conveniente incluir no estudo funcional da variação de sequência rs3125 mais mulheres com diagnóstico provável de vcDFT e saudáveis, representativas de todos os genótipos, para aumentar o poder estatístico. Seria igualmente interessante realizar o referido estudo nas plaquetas de homens com diagnóstico provável de vcDFT e homens saudáveis para averiguar a existência de diferenças associadas aos géneros.

A realização do estudo funcional da variação de sequência rs3125 em tecido cerebral *pós-mortem* de doentes com diagnóstico provável de vcDFT e indivíduos saudáveis daria um contributo muito importante, uma vez que possibilitaria determinar se, no tecido afetado por esta patologia, ocorrem as alterações observadas nas plaquetas.

6. Conclusões

Os resultados deste estudo permitem concluir que as variações de sequência identificadas no gene *HTR2A* não constituem uma causa primária para a etiologia da DLFT. Contudo, a variação de sequência rs3125 localizada na região reguladora 3'UTR do gene *HTR2A* constitui um possível fator de risco genético associado ao desenvolvimento de vcDFT nas mulheres, nomeadamente a perda de heterozigotia e o aumento das frequências do genótipo GG e do alelo G. A diminuição estatisticamente significativa da expressão relativa do transcrito NM_000621.4 do gene *HTR2A* nas mulheres com diagnóstico provável de vcDFT com expressão monoalélica G comparativamente às mulheres saudáveis G poderá constituir uma possível justificação para a associação obtida.

Tendo em conta a literatura científica disponível, este estudo forneceu a primeira evidência de que o gene *HTR2A* poderá estar envolvido na suscetibilidade para a vcDFT, sendo, por isso, uma contribuição relevante para o esclarecimento da patogenicidade da DLFT.

7. Referências bibliográficas

- Abdolmaleky HM, Faraone SV, Glatt SJ & Tsuang MT, Meta - analysis of association between the T102C polymorphism of the 5HT2a receptor gene and schizophrenia, *Schizophrenia research*, 2004, 67(1): 53-62.
- Affolter H, Erne P, Buergisser E & Pletscher A, Ca²⁺ as messenger of 5-HT₂-receptor stimulation in human blood platelets, *Archives of neurology*, 1984, 325(4): 337-342.
- Agilent Technologies, Agilent RNA 6000 Pico Kit, Agilent Technologies, Inc., Waldbronn, Germany, 2006, pp 1-4.
- Akin D, Manier DH, Sanders-Bush E & Shelton RC, Decreased serotonin 5-HT_{2A} receptor - stimulated phosphoinositide signaling in fibroblasts from melancholic depressed patients, *Neuropsychopharmacology*, 2004, 29(11): 2081-2087.
- Almeida S, Gascon E, Tran H, Chou HJ, Gendron TF, Degroot S, Tapper AR, Sellier C, Charlet-Berguerand N, Karydas A, Seeley WW, Boxer AL, Petrucelli L, Miller BL & Gao FB, Modeling key pathological features of frontotemporal dementia with C9ORF72 repeat expansion in iPSC - derived human neurons, *Acta neuropathologica*, 2013, 126(3): 385-399.
- Alzheimer A, Über eigenartige Krankheitsfälle des späten Alters, *Zeitschrift für die gesamte neurologie und psychiatrie*, 1911, 4(1): 356-385.
- Aman P, Panagopoulos I, Lassen C, Fioretos T, Mencinger M, Toresson H, Höglund M, Forster A, Rabbitts TH, Ron D, Mandahl N & Mitelman F, Expression patterns of the human - sarcoma associated genes FUS and EWS and the genomic structure of FUS, *Genomics*, 1996, 37(1): 1-8.
- Applied Biosystems, ABI PRISM[®] SNaPshot[™] Multiplex Kit, Protocol, Applied Biosystems, USA, 2010b, pp 1-17.
- Applied Biosystems, BigDye[®] Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit, Protocol, Applied Biosystems, USA, 2010a, Cap 3: pp 1-1 - 3-7.
- Applied Biosystems[™] by life technologies[™], TaqMan[®] Gene Expression Assays Protocol, Life Technologies Corporation, 2010, pp 9-30.
- Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y & Oda T, TDP-43 is a component of ubiquitin - positive tau - negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis, *Biochemical and biophysical research communications*, 2006, 351(3): 602-611.
- Arranz M, Collier D, Sodhi M, Ball D, Roberts G, Price J, Sham P & Kerwin R, Association between clozapine response and allelic variation in 5-HT_{2A} receptor gene, *Lancet*, 1995, 346(8970): 281-282.
- Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N & Patel HR, Basic principles of real-time quantitative PCR, *Expert review of molecular diagnostics*, 2005, 5(2): 209-219.
- Arzt E, Costas M, Finkielman S & Nahmod VE, Serotonin inhibition of tumor necrosis factor - alpha synthesis by human monocytes, *Life sciences*, 1991, 48(26): 2557-2562.
- Assal F, Alarcón M, Solomon EC, Masterman D, Geschwind DH & Cummings JL, Association of the serotonin transporter and receptor gene polymorphisms in neuropsychiatric symptoms in Alzheimer disease, *Archives of neurology*, 2004, 61(8): 1249-1253.
- Azzi A, Boscoboinik D & Hensey C, The protein kinase C family, *European journal of biochemistry/FEBS*, 1992, 208(3): 547-557.
- Babst M, A protein's final ESCRT, *Traffic*, 2005, 6(1): 2-9.
- Babst M, Katzmann DJ, Snyder WB, Wendland B & Emr SD, Endosome - associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body, *Developmental cell*, 2002, 3(2): 283-289.

- Baechtold H, Kuroda M, Sok J, Ron D, Lopez BS & Akhmedov AT, Human 75-kDa DNA - pairing protein is identical to the pro - oncoprotein TLD/FUS and is able to promote D-loop formation, *The Journal of biological chemistry*, 1999, 274(48): 34337-34342.
- Baker M, Kwok JB, Kucera S, Crook R, Farrer M, Houlden H, Isaacs A, Lincoln S, Onstead L, Hardy J, Wittenberg L, Dodd P, Webb S, Hayward N, Tannenberg T, Andreadis A, Hallupp M, Schofield P, Dark F & Hutton M, Localization of frontotemporal dementia with parkinsonism in an Australian kindred to chromosome 17q21 - 22, *Annals of neurology*, 1997, 42(5): 794-798.
- Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, Lindholm C, Snowden J, Adamson J, Sadovnick AD, Rollinson S, Cannon A, Dwosh E, Neary D, Melquist S, Richardson A, Dickson D, Berger Z, Eriksen J, Robinson T, Zehr C, Dickey CA, Crook R, McGowan E, Mann D, Boeve B, Feldman H & Hutton M, Mutations in progranulin cause tau - negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17, *Nature*, 2006, 442(7105): 916-919.
- Baltimore D, RNA - dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses, *Nature*, 1970, 226(5252): 1209-1211.
- Barrett LW, Fletcher S & Wilton SD, Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non - coding elements, *Cellular and molecular life sciences*, 2012, 69(21): 3613-3634.
- Bartel DP, MicroRNAs: target recognition and regulatory functions, *Cell*, 2009, 136(2): 215-233.
- Bartlett JMS & Stirling D, A Short History of the polymerase Chain Reaction, *in: PCR Protocols, Methods in Molecular Biology™*, Second Edition, Bartlett JMS & Stirling D, Humana Press Inc, Totowa, NJ, 2003, Vol. 226, Cap 1: pp 3-6.
- Bartlett JMS, RNA Extraction from Frozen tissue, *in: PCR Protocols, Methods in Molecular Biology™*, Second Edition, Bartlett JMS & Stirling D, Humana Press Inc, Totowa, NJ, 2003, Vol. 226, Cap 10: pp 45-46.
- Bas A, Forsberg G, Hammarström S & Hammarström ML, Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta - actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes, *Scandinavian journal of immunology*, 2004, 59(6): 566-573.
- Basun H, Almkvist O, Axelman K, Brun A, Campbell TA, Collinge J, Forsell C, Froelich S, Wahlund LO, Wetterberg L & Lannfelt L, Clinical characteristics of a chromosome 17 - linked rapidly progressive familial frontotemporal dementia, *Archives of neurology*, 1997, 54(5): 539-544.
- Bej AK, Mahbubani MH & Atlas RM, Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications, *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 1991, 26(3-4): 301-334.
- Benajiba L, Le Ber I, Camuzat A, Lacoste M, Thomas-Anterion C, Couratier P, Legallic S, Salachas F, Hannequin D, Decousus M, Lacomblez L, Guedj E, Golfier V, Camu W, Dubois B, Champion D, Meininger V, Brice A & French Clinical and Genetic Research Network on Frontotemporal Lobar Degeneration/Frontotemporal Lobar Degeneration with Motoneuron Disease, TARDBP mutations in motoneuron disease with frontotemporal lobar degeneration, *Annals of neurology*, 2009, 65(4): 470-473.
- Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J & Sayers EW, GenBank, *Nucleic acids research*, 2013, 41(Database issue): D36-D42.
- Berg JM, Tymoczko JL & Stryer L, DNA, RNA, and the flow of genetic information, *in: Biochemistry, Fifth Edition*, Freeman WH, New York, 2002, Cap 5: pp 117-142.
- Berger M, Gray JA & Roth BL, The expanded biology of serotonin, *Annual review of medicine*, 2009, 60: 355-366.

- Berr C, Wancata J & Ritchie K, Prevalence of dementia in the elderly in Europe, *European neuropsychopharmacology*, 2005, 15(4): 463-471.
- Berridge MJ, Dawson RM, Downes CP, Heslop JP & Irvine RF, Changes in the levels of inositol phosphates after agonist - dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides, *The Biochemical journal*, 1983, 212(2): 473-482.
- Berridge MJ, Rapid accumulation of inositol triphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol, *The Biochemical journal*, 1983, 212(3): 849-858.
- Bersano A, Del Bo R, Lamperti C, Ghezzi S, Fagiolari G, Fortunato F, Ballabio E, Moggio M, Candelise L, Galimberti D, Virgilio R, Lanfranconi S, Torrente Y, Carpo M, Bresolin N, Comi GP & Corti S, Inclusion body myopathy and frontotemporal dementia caused by a novel VCP mutation, *Neurobiology of aging*, 2009, 30(5): 752-758.
- Bertrand P, Akhmedov AT, Delacote F, Durrbach A & Lopez BS, Human POMp75 is identified as the pro - oncoprotein TLS/FUS: both POMp75 and POMp100 DNA homologous pairing activities are associated to cell proliferation, *Oncogene*, 1999, 18(31): 4515-4521.
- Betts MJ & Russell RB, Amino Acid properties and consequences of substitutions, *in: Bioinformatics for geneticists*, First Edition, Barnes M & Gray I, Wiley, John & Sons, United Kingdom, 2003, Cap 14: pp 289-316.
- Bhandari V & Bateman A, Structure and chromosomal location of the human granulin gene, *Biochemical and biophysical research communications*, 1992, 188(1): 57-63.
- Bikandi J, San Millán R, Rementeria A & Garaizar J, *In silico* analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction, *Bioinformatics*, 2004, 20(5): 798-799.
- Bird TD, Jarvik GP & Wood NW, Genetic association studies: genes in search of diseases, *Neurology*, 2001, 57(7): 1153-1154.
- Bird TD, Wijsman EM, Nochlin D, Leehey M, Sumi SM, Payami H, Poorkaj P, Nemens E, Rafkind M & Schellenberg GD, Chromosome 17 and hereditary dementia: linkage studies in three non - Alzheimer families and kindreds with late - onset FAD, *Neurology*, 1997, 48(4): 949-954.
- Birschmann I, Mietner S, Dittrich M, Pfrang J, Dandekar T & Walter U, Use of functional highly purified human platelets for the identification of new proteins of the IPP signaling pathway, *Thrombosis research*, 2008, 122(1): 59-68.
- Birzniece V, Bäckström T, Johansson IM, Lindblad C, Lundgren P, Löfgren M, Olsson T, Ragagnin G, Taube M, Turkmen S, Wahlström G, Wang MD, Wihlbäck AC & Zhu D, Neuroactive steroid effects on cognitive functions with a focus on the serotonin and GABA systems, *Brain research reviews*, 2006, 51(2): 212-239.
- Black SE, Patterson C & Feightner J, Preventing dementia, *The Canadian journal of neurological sciences*, 2001, Suppl 1: S56-S66.
- Blin J, Baron JC, Dubois B, Crouzel C, Fiorelli M, Attar-Lévy D, Pillon B, Fournier D, Vidailhet M & Agid Y, Loss of brain 5-HT₂ receptors in Alzheimer's disease. *In vivo* assessment with positron emission tomography and [18F]setoperone, *Brain*, 1993, 116 (Pt 3): 497-510.
- Boeve BF, Baker M, Dickson DW, Parisi JE, Giannini C, Josephs KA, Hutton M, Pickering-Brown SM, Rademakers R, Tang-Wai D, Jack CR Jr, Kantarci K, Shiung MM, Golde T, Smith GE, Geda YE, Knopman DS & Petersen RC, Frontotemporal dementia and parkinsonism associated with the IVS1+1G>A mutation in progranulin: a clinicopathologic study, *Brain*, 2006, 129(Pt 11): 3103-3114.
- Bohorova N, Fenell S, McLean S, Pellegrineschi A & Hoisington D, Quantification and Quality Control of DNA, *in: Laboratory protocols*, CIMMYT Applied Genetic Engineering Laboratory, Bohorova,

- N, Fenell S, McLean S, Pellegrineschi A & Hoisington D, D.F.: CIMMYT, Mexico, 1999, pp 87-88.
- Borghero G, Floris G, Cannas A, Marrosu MG, Murru MR, Costantino E, Parish LD, Pugliatti M, Ticca A, Traynor BJ, Calvo A, Cammarosano S, Moglia C, Cistaro A, Brunetti M, Restagno G & Chiò A, A patient carrying a homozygous p.A382T TARDBP missense mutation shows a syndrome including ALS, extrapyramidal symptoms, and FTD, *Neurobiology of aging*, 2011, 32(12): 2327.
- Borroni B, Alberici A, Grassi M, Turla M, Zanetti O, Bianchetti A, Dalla Volta G, Rozzini R, Gilberti N, Bellelli G & Padovani A, Is frontotemporal lobar degeneration a rare disorder? Evidence from a preliminary study in Brescia County, Italy, *Journal of Alzheimer's disease*, 2010, 19(1): 111-116.
- Borroni B, Bonvicini C, Alberici A, Buratti E, Agosti C, Archetti S, Papetti A, Stuani C, Di Luca M, Gennarelli M & Padovani A, Mutation within TARDBP leads to frontotemporal dementia without motor neuron disease, *Human mutation*, 2009, 30(11): E974-E983.
- Bowen RA, Austgen L & Rouge M, Genetic Engineering and Biotechnology, 2000.
- Böyum A, Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g, *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation, Supplementum*, 1968, 97: 77-89.
- Brandt R, Hundelt M & Shahani N, Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models, *Biochimica et biophysica acta*, 2005, 1739(2-3): 331-354.
- Bray NJ, Buckland PR, Owen MJ & O'Donovan MC, Cis - acting variation in the expression of a high proportion of genes in human brain, *Human genetics*, 2003, 113(2): 149-153.
- Brodie BB & Shore PA, A concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1957, 66(3): 631-642.
- Brown J, Ashworth A, Gydesen S, Sorensen A, Rossor M, Hardy J & Collinge J, Familial non - specific dementia maps to chromosome 3, *Human Molecular Genetics*, 1995, 4(9): 1625-1628.
- Bugert P, Dugrillon A, Gunaydin A, Eichler H & Kluter H, Messenger RNA profiling of human platelets by microarray hybridization, *Thrombosis and haemostasis*, 2003, 90(4): 738-748.
- Buhot MC, Martin S & Segu L, Role of serotonin in memory impairment, *Annals of Medicine*, 2000, 32(3): 210-221.
- Bustin SA & Nolan T, Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction, *Journal of biomolecular techniques*, 2004, 15(3): 155-166.
- Bustin SA, Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays, *Journal of molecular endocrinology*, 2000, 25(2): 169-193.
- Cairns NJ, Neumann M, Bigio EH, Holm IE, Troost D, Hatanpaa KJ, Foong C, White CL 3rd, Schneider JA, Kretschmar HA, Carter D, Taylor-Reinwald L, Paulsmeyer K, Strider J, Gitcho M, Goate AM, Morris JC, Mishra M, Kwong LK, Stieber A, Xu Y, Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM & Mackenzie IR, TDP-43 in familial and sporadic frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin inclusions, *The American journal of pathology*, 2007, 171(1): 227-240.
- Calverley DC, Phang TL, Choudhury QG, Gao B, Oton AB, Weyant MJ & Geraci MW, Significant downregulation of platelet gene expression in metastatic lung cancer, *Clinical and translational science*, 2010, 3(5): 227-232.
- Cannon A, Baker M, Boeve B, Josephs K, Knopman D, Petersen R, Parisi J, Dickison D, Adamson J, Snowden J, Neary D, Mann D, Hutton M & Pickering-Brown SM, CHMP2B mutations are not a common cause of frontotemporal lobar degeneration, *Neuroscience letters*, 2006, 398(1-2): 83-84.

- Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Shaw N, Lane CR, Lim EP, Kalyanaraman N, Nemesh J, Ziaugra L, Friedland L, Rolfe A, Warrington J, Lipshutz R, Daley GQ & Lander ES, Characterization of single - nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes, *Nature genetics*, 1999, 22(3): 231-238.
- Carlberg C, Seuter S, de Mello VD, Schwab U, Voutilainen S, Pulkki K, Nurmi T, Virtanen J, Tuomainen TP & Uusitupa M, Primary Vitamin D Target Genes Allow a Categorization of Possible Benefits of Vitamin D3 Supplementation, *PLoS One*, 2013, 8(7): e71042.
- Catricala S, Torti M & Ricevuti G, Alzheimer disease and platelets: how's that relevant, *Immunity & ageing*, 2012, 9(1): 20.
- Chakravarti A, Population genetics - making sense out of sequence, *Nature genetics*, 1999, 21(1 Suppl): 56-60.
- Chatterjee S, Berwal SK & Pal JK, Pathological mutations in 5'untranslated regions of human genes, *in: Encyclopedia of life sciences (ELS)*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2010.
- Chen K, Yang W, Grimsby J & Shih JC, The human 5-HT₂ receptor is encoded by a multiple intron - exon gene, *Molecular brain research*, 1992, 14(1-2): 20-26.
- Cheung VG & Spielman RS, Genetics of human gene expression: mapping DNA variants that influence gene expression, *Nature reviews, genetics*, 2009, 10(9): 595-604.
- Chon H, Gaillard CA, van der Meijden BB, Dijkstra-Hoogmoed HM, Kraaijenhagen RJ, van Leenen D, Holstege FC, Joles JA, Bluysen HA, Koomans HA & Braam B, Broadly altered gene expression in blood leukocytes in essential hypertension is absent during treatment, *Hypertension*, 2004, 43(5): 947-951.
- Chow TW, Miller BL, Hayashi VN & Geschwind DH, Inheritance of frontotemporal dementia, *Archives of neurology*, 1999, 56(7): 817-822.
- Cloëz-Tayarani I, Petit-Bertron AF, Venters HD & Cavillon JM, Differential effect of serotonin on cytokine production in lipopolysaccharide - stimulated human peripheral blood mononuclear cells: involvement of 5-hydroxytryptamine 2A receptors, *International immunology*, 2003, 15(2): 233-240.
- Conn PJ & Sanders-Bush E, Selective 5HT-2 antagonists inhibit serotonin stimulated phosphatidylinositol metabolism in cerebral cortex, *Neuropharmacology*, 1984, 23(8): 993-996.
- Constantinidis J, Richard J & Tissot R, Pick's Disease, Histological and clinical correlations, *European neurology*, 1974, 11(4): 208-217.
- Cook EH Jr, Fletcher KE, Wainwright M, Marks N, Yan SY & Leventhal BL, Primary structure of the human platelet serotonin 5-HT_{2A} receptor: identify with frontal cortex serotonin 5-HT_{2A} receptor, *Journal of neurochemistry*, 1994, 63(2): 465-469.
- Cooper PN, Jackson M, Lennox G, Lowe J & Mann DM, Tau, ubiquitin, and alpha B-crystallin immunohistochemistry define the principal causes of degenerative frontotemporal dementia, *Archives of neurology*, 1995, 52(10): 1011-1015.
- Correia C, Epidemiologia genética, *Revista factores de risco*, 2008, 8: 60-65.
- Crozat A, Aman P, Mandahl N & Ron D, Fusion of CHOP to a novel RNA - binding protein in human myxoid liposarcoma, *Nature*, 1993, 363(6430): 640-644.
- Cruts M, Gijssels I, van der Zee J, Engelborghs S, Wils H, Pirici D, Rademakers R, Vandenberghe R, Dermaut B, Martin JJ, van Duijn C, Peeters K, Sciot R, Santens P, De Pooter T, Mattheijssens M, Van den Broeck M, Cuijt I, Vennekens K, De Deyn PP, Kumar-Singh S & Van Broeckhoven C, Null mutations in progranulin cause ubiquitin - positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21, *Nature*, 2006, 442(7105): 920-924.

- Cruts M, Rademakers R, Gijssels I, van der Zee J, Dermaut B, de Pooter T, de Rijk P, Del-Favero J & van Broeckhoven C, Genomic architecture of human 17q21 linked to frontotemporal dementia uncovers a highly homologous family of low - copy repeats in the tau region, *Human molecular genetics*, 2005, 14(13): 1753-1762.
- Cruts M, Theuns J & Van Broeckhoven C, Locus - specific databases for neurodegenerative brain diseases, *Human mutation*, 2012, 33(9): 1340-1344.
- Cupello A, Favale E, Audenino D, Scarrone S, Gastaldi S & Albano C, Decrease of serotonin transporters in blood platelets after epileptic seizures, *Neurochemical research*, 2005, 30(4): 425-428.
- Curcio SA, Kawarai T, Paterson AD, Maletta RG, Puccio G, Perri M, Di Natale M, Palermo S, Foncin JF, Hyslop PH & Bruni AC, A large Calabrian kindred segregating frontotemporal dementia, *Journal of neurology*, 2002, 249(7): 911-922.
- Cutter WJ, Craig M, Norbury R, Robertson DM, Whitehead M & Murphy DG, In vivo effects of estrogen on human brain, *Annals of the New York Academy Sciences*, 2003, 1007: 79-88.
- Dai RM & Li CC, Valosin - containing protein is a multi - ubiquitin chain - targeting factor required in ubiquitin - proteasome degradation, *Nature cell biology*, 2001, 3(8): 740-744.
- Dale JW & von Schantz M, Analysis of gene expression, *In: From genes to genomes: concepts and applications of DNA technology*, Dale JW & von Schantz M, John Wiley & Sons, LTD, United Kingdom, 2002, Cap 13: pp 253-257.
- Daniels SE, Preparation and direct automated cycle sequencing of PCR products, *in: PCR Protocols, Methods in Molecular Biology™*, Second Edition, Bartlett JMS & Stirling D, Humana Press, Totowa, NJ, 2003, Vol. 226, Cap 50: pp 341-346.
- Davidson Y, Kelley T, Mackenzie IR, Pickering-Brown S, Du Plessis D, Neary D, Snowden JS & Mann DM, Ubiquitinated pathological lesions in frontotemporal lobar degeneration contain the TAR DNA-binding protein, TDP-43, *Acta neuropathologica*, 2007, 113(5): 521-533.
- de Chaffoy de Courcelles D, Leysen JE, De Clerck F, Van Belle H & Janssen PA, Evidence that phospholipid turnover is the signal transducing system coupled to serotonin-2 receptor sites, *The journal of biological chemistry*, 1985, 260(12): 7603-7608.
- de Wit LEA & Sluiter W, Reliable assay for measuring complex I activity in human blood lymphocytes and skin fibroblasts, *Methods in Enzymology*, 2009, 456: 169-181.
- DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J, Kouri N, Wojtas A, Sengdy P, Hsiung GY, Karydas A, Seeley WW, Josephs KA, Coppola G, Geschwind DH, Wszolek ZW, Feldman H, Knopman DS, Petersen RC, Miller BL, Dickson DW, Boylan KB, Graff-Radford NR & Rademakers R, Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of *C9ORF72* causes chromosome 9p - linked FTD and ALS, *Neuron*, 2011, 72(2): 245-256.
- Deng GR, A sensitive non - radioactive PCR-RFLP analysis for detecting point mutations at 12th codon of oncogene c-Ha-ras in DNAs of gastric cancer, *Nucleic acids research*, 1988, 16(13): 6231.
- Denis MM, Tolley ND, Bunting M, Schwertz H, Jiang H, Lindemann S, Yost CC, Rubner FJ, Albertine KH, Swoboda KJ, Fratto CM, Tolley E, Kraiss LW, McIntyre TM, Zimmerman GA & Weyrich AS, Escaping the nuclear confines: Signal - dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets, *Cell*, 2005, 122(3): 379-391.
- Diel P, Tissue - specific estrogenic response and molecular mechanisms, *Toxicology letters*, 2002, 127(1-3): 217-224.
- Djamshidian A, Schaefer J, Haunenberger D, Stogmann E, Zimprich F, Auff E & Zimprich A, A novel mutation in the VCP gene (G157R) in a german family with inclusion - body myopathy with paget disease of bone and frontotemporal dementia, *Muscle & nerve*, 2009, 39(3): 389-391.

- Dubovsky SL & Thomas M, Beyond specificity: effects of serotonin and serotonergic treatments on psychobiological dysfunction, *Journal of psychosomatic research*, 1995, 39(4): 429-444.
- Dugan KA, Lawrence HS, Hares DR, Fisher CL & Budowle B, An improved method for post - PCR purification for mtDNA sequence analysis, *Journal of forensic sciences*, 2002, 47(4): 811-818.
- Dunnen JT den & Antonarakis SE, Nomenclature for the description of human sequence variations, *Hum Genet*, 2001, 109: 121-124.
- Dürk T, Panther E, Müller T, Sorichter S, Ferrari D, Pizzirani C, Di Virgilio F, Myrtek D, Norgauer J & Idzko M, 5-Hydroxytryptamine modulates cytokine and chemokine production in LPS - primed human monocytes via stimulation of different 5-HTR subtypes, *International immunology*, 2005, 17(5): 599-606.
- Dussault AA & Pouliot M, Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR, *Biological procedures online*, 2006, 8: 1-10.
- Edelstein LC & Bray PF, MicroRNAs in platelet production and activation, *Blood*, 2011, 117(20): 5289-5296.
- Elliott JM & Kent A, Comparison of [125]iodolysergic acid diethylamide binding in human frontal cortex and platelet tissue, *Journal of neurochemistry*, 1989, 53(1): 191-196.
- Erdmann J, Shimron-Abarbanell D, Rietschel M, Albus M, Maier W, Körner J, Bondy B, Chen K, Shih JC, Knapp M, Propping P & Nöthen MM, Systematic screening for mutations in the human serotonin-2A (5-HT_{2A}) receptor gene: identification of two naturally occurring receptor variants and association analysis in schizophrenia, *Human genetics*, 1996, 97(5): 614-619.
- Erspamer V & Asero B, Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine, *Nature*, 1952, 169(4306): 800-801.
- Erspamer V & Boretti G, Identification and characterization, by paper chromatography, of enteramine, octopamine, tyramine, histamine and allied substances in extracts of posterior salivary glands of octopoda and in other tissue extracts of vertebrates and invertebrates, *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*, 1951, 88(3): 296-332.
- Erspamer V & Ghiretti F, The action of enteramine on the heart of molluscs, *The journal of physiology*, 1951, 115(4): 470-481.
- Erspamer V & Ottolenghi A, Preliminary researches on the mechanism of the antidiuretic action of enteramine, *Experientia*, 1951, 7(5): 191-192.
- Erspamer V & Vialli M, Presence of enteramine in the skin of Amphibia, *Nature*, 1951, 167(4260): 1033.
- Erspamer V & Vialli M, Ricerche sul secreto delle cellule enterocromaffini, *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 1937, 27(1): 81-99.
- Erspamer V, Active substances in the posterior salivary glands of Octopoda. I. Enteramine - like substance, *Acta pharmacologica et toxicologica*, 1948, 4(3-4): 213-223.
- Erspamer V, Presenza di enteramina o di una sostanza enteraminosimile negliestratti gastroenterici delle Ascidie, *Experientia*, 1946, 2(9): 369-371.
- Esmonde TF, Creutzfeldt-Jakob disease and other degenerative causes of dementia, *in: Principles and practice of geriatric psychiatry*, Second Edition, Copeland JR, Abou-Saleh MT & Blazer DG, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, 2002, Cap 51a: pp 278-279.
- Fairchild A, Lee MD & Maurer JJ, PCR Basis, *in: PCR Methods in Foods, Food microbiology and food safety*, Maurer J, Springer Science+ Business Media, Inc., NY, USA, 2006, Cap 1: pp 1-25.
- Faraj BA, Olkowski ZL & Jackson RT, Expression of a high - affinity serotonin transporter in human lymphocytes, *International journal of immunopharmacology*, 1994, 16(7): 561-567.

- Fecto F, Yan J, Vemula SP, Liu E, Yang Y, Chen W, Zheng JG, Shi Y, Siddique N, Arrat H, Donkervoort S, Ajroud-Driss S, Sufit RL, Heller SL, Deng HX & Siddique T, SQSTM1 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis, *Archives of neurology*, 2011, 68(11): 1440-1446.
- Ferrari R, Kapogiannis D, Huey ED, Grafman J, Hardy J & Momeni P, Novel missense mutation in charged multivesicular body protein 2B in a patient with frontotemporal dementia, *Alzheimer disease and associated disorders*, 2010, 24(4): 397-401.
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczufca M & Alzheimer's Disease International, Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study, *Lancet*, 2005, 366(9503): 2112-2117.
- Ficoll-Paque, Isolation of mononuclear cells, Methodology and applications, General Electric Company, Sweden, 2007, pp 5-14.
- Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, Yamamoto A, Malerød L, Fisher EM, Isaacs A, Brech A, Stenmark H & Simonsen A, Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease, *The Journal of cell biology*, 2007, 179(3): 485-500.
- Filip M, Frankowska M, Zaniewska M, Golda A & Przegaliński E, The serotonergic system and its role in cocaine addiction, *Pharmacological Reports: PR*, 2005, 57(6): 685-700.
- Finnzymes, Phire™ Hot Start DNA Polymerase, Finnzymes OY, Espoo, Finland, 2008.
- Foster NL, Wilhelmsen K, Sima AA, Jones MZ, D'Amato CJ, Gilman S & Conference participants, Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: a consensus conference, *Annals of neurology*, 1997, 41(6): 706-715.
- Franceschi M, Anchisi D, Pelati O, Zuffi M, Matarrese M, Moresco RM, Fazio F & Perani D, Glucose metabolism and serotonin receptors in the frontotemporal lobe degeneration, *Annals of neurology*, 2005, 57(2): 216-225.
- Francis PT, Holmes C, Webster MT, Stratmann GC, Procter AW & Bowden DM, Preliminary neurochemical findings in non - Alzheimer dementia due to lobar atrophy, *Dementia (Basel, Switzerland)*, 1993, 4(3-4): 172-177.
- Froelich Fabre S, Axelman P, Almkvist A, Basun H & Lannfelt L, Extended investigation of tau and mutation screening of other candidate genes on chromosome 17q21 in a Swedish FTDP-17 family, *American journal of medical genetics, Part B, Neuropsychiatric genetics*, 2003, 121B(1): 112-118.
- Froelich S, Basun H, Forsell C, Lilius L, Axelman K, Andreadis A & Lannfelt L, Mapping of a disease locus for familial rapidly progressive frontotemporal dementia to chromosome 17q12 - 21, *American journal of medical genetics*, 1997, 74(4): 380-385.
- Fujita PA, Rhead B, Zweig AS, Hinrichs AS, Karolchik D, Cline MS, Goldman M, Barber GP, Clawson H, Coelho A, Diekhans M, Dreszer TR, Giardine BM, Harte RA, Hillman-Jackson J, Hsu F, Kirkup V, Kuhn RM, Learned K, Li CH, Meyer LR, Pohl A, Raney BJ, Rosenbloom KR, Smith KE, Haussler D & Kent WJ, The UCSC Genome Browser database: update 2011, *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(Database issue): D876-D882.
- Gaddum JH & Picarelli ZP, Two kinds of tryptamine receptors, *British journal of pharmacology and chemotherapy*, 1957, 12(3): 323-328.
- Galimberti D & Scarpini E, Genetics of frontotemporal lobar degeneration, *Frontiers in neurology*, 2012, 3: 52.
- Gans A, Betrachtungen über Art and Ausbreitung des krankhaften Prozesses in einem Fall von Pickscher Atrophie des Stirnhirns, *Zeitschrift für die gesamte neurologie und psychiatrie*, 1922, 80(1): 10-28.

- Gass J, Cannon A, Mackenzie IR, Boeve B, Baker M, Adamson J, Crook R, Melquist S, Kuntz K, Petersen R, Josephs K, Pickering-Brown SM, Graff-Radford N, Uitti R, Dickson D, Wszolek Z, Gonzalez J, Beach TG, Bigio E, Johnson N, Weintraub S, Mesulam M, White CL 3rd, Woodruff B, Caselli R, Hsiung GY, Feldman H, Knopman D, Hutton M & Rademakers R, Mutations in progranulin are a major cause of ubiquitin - positive frontotemporal lobar degeneration, 2006, *Human molecular genetics*, 15(20): 2988-3001.
- Geaney DP, Schachter M, Elliot JM & Grahame SD, Characterization of [3H]lysergic acid diethylamide binding to a 5-hydroxytryptamine receptor on human platelet membranes, *European journal of pharmacology*, 1984, 97(1-2): 87-93.
- Gennari L, Gianfrancesco F, Di Stefano M, Rendina D, Merlotti D, Esposito T, Gallone S, Fusco P, Rainero I, Fenoglio P, Mancini M, Martini G, Bergui S, De Filippo G, Isaia G, Strazzullo P, Nuti R & Mossetti G, SQSTM1 gene analysis and gene - environment interaction in Paget's disease of bone, *Journal of bone and mineral research*, 2010, 25(6): 1375-1384.
- Gijssels I, Engelborghs S, Maes G, Cuijt I, Peeters K, Mattheijssens M, Joris G, Cras P, Martin JJ, De Deyn PP, Kumar-Singh S, Van Broeckhoven C & Cruts M, Identification of 2 Loci at chromosomes 9 and 14 in a multiplex family with frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis, *Archives of neurology*, 2010, 67(5): 606-616.
- Gijssels I, van der Zee J, Engelborghs S, Goossens D, Peeters K, Mattheijssens M, Corsmit E, Delfavero J, De Deyn PP, Van Broeckhoven C & Cruts M, Progranulin locus deletion in frontotemporal dementia, *Human Mutation*, 2008, 29(1): 53-58.
- Gijssels I, Van Langenhove T, van der Zee J, Slegers K, Philtjens S, Kleinberger G, Janssens J, Bettens K, Van Cauwenberghe C, Pereson S, Engelborghs S, Sieben A, De Jonghe P, Vandenberghe R, Santens P, De Bleecker J, Maes G, Bäumer V, Dillen L, Joris G, Cuijt I, Corsmit E, Elinck E, Van Dongen J, Vermeulen S, Van den Broeck M, Vaerenberg C, Mattheijssens M, Peeters K, Robberecht W, Cras P, Martin JJ, De Deyn PP, Cruts M & Van Broeckhoven C, A C9orf72 promoter repeat expansion in a Flanders - Belgian cohort with disorders of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum: a gene identification study, *Lancet neurology*, 2012, 11(1): 54-65.
- Gimelbrant A, Hutchinson JN, Thompson BR & Chess A, Widespread Monoallelic Expression on Human Autosomes, *Science*, 2007, 318(5853): 1136-1140.
- Ginzinger DG, Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream, *Experimental hematology*, 2002, 30(6): 503-512.
- Gitcho MA, Baloh RH, Chakraverty S, Mayo K, Norton JB, Levitch D, Hatanpaa KJ, White CL 3rd, Bigio EH, Caselli R, Baker M, Al-Lozi MT, Morris JC, Pestronk A, Rademakers R, Goate AM & Cairns NJ, TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease, *Annals of neurology*, 2008, 63(4): 535-538.
- Gitcho MA, Bigio EH, Mishra M, Johnson N, Weintraub S, Mesulam M, Rademakers R, Chakraverty S, Cruchaga C, Morris JC, Goate AM & Cairns NJ, TARDBP 3'-UTR variant in autopsy - confirmed frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 proteinopathy, *Acta neuropathologica*, 2009b, 118(5): 633-645.
- Gitcho MA, Strider J, Carter D, Taylor-Reinwald L, Forman MS, Goate AM & Cairns NJ, VCP mutations causing frontotemporal lobar degeneration disrupt localization of TDP-43 and induce cell death, *The Journal of biological chemistry*, 2009a, 284(18): 12384-12398.
- Gladkevich A, Kauffman HF & Korf J, Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders, *Progress in neuropsychopharmacology & biological psychiatry*, 2004, 28(3): 559-576.

- Gnatenko DV, Dunn JJ, McCorkle SR, Weissmann D, Perrotta PL & Bahou WF, Transcript profiling of human platelets using microarray and serial analysis of gene expression, *Blood*, 2003, 101(6): 2285-2293.
- Goedert M, Tau protein and neurodegeneration, *Seminars in cell & developmental biology*, 2004, 15(1): 45-49.
- Goldman JS, Adamson J, Karydas A, Miller BL & Hutton M, New genes, new dilemmas: FTLT genetics and its implications for families, *American journal of Alzheimer's disease and other dementias*, 2007, 22(6): 507-515.
- Goldman JS, Farmer JM, Wood EM, Johnson JK, Boxer A, Neuhaus J, Lomen-Hoerth C, Wilhelmsen KC, Lee VM, Grossman M & Miller BL, Comparison of family histories in FTLT subtypes and related tauopathies, *Neurology*, 2005, 65(11): 1817-1819.
- Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S, Kertesz A, Mendez M, Cappa SF, Ogar JM, Rohrer JD, Black S, Boeve BF, Manes F, Dronkers NF, Vandenberghe R, Rascovsky K, Patterson K, Miller BL, Knopman DS, Hodges JR, Mesulam MM & Grossman M, Classification of primary progressive aphasia and its variants, *Neurology*, 2011, 76(11): 1006-1014.
- Graham GJ, Stevens JM, Page NM, Grant AD, Brain SD, Lowry PJ & Gibbins JM, Tachykinins regulate the function of platelets, *Blood*, 2004, 104(4): 1058-1065.
- Grazina M, Silva F, Santana I, Santiago B, Mendes C, Simões M, Oliveira M, Cunha L & Oliveira C, Frontotemporal dementia and mitochondrial DNA transitions, *Neurobiology of disease*, 2004, 15(2): 306-311.
- Grunenwald H, Optimization of Polymerase Chain Reactions, *in: PCR Protocols, Methods in Molecular Biology™*, Second Edition, Bartlett JMS & Stirling D, Humana Press, Totowa, NJ, 2003, Vol. 226, Cap 20: pp 89-99.
- Guhathakurta S, Singh AS, Sinha S, Chatterjee A, Ahmed S, Ghosh S & Usha R, Analysis of serotonin receptor 2A gene (*HTR2A*): Association study with autism spectrum disorder in the Indian population and investigation of the gene expression in peripheral blood leukocytes, *Neurochemistry international*, 2009, 55(8): 754-759.
- Guimarães J, Fonseca R & Garrett C, Demência Frontotemporal, Que entidade?, *Acta Médica Portuguesa*, 2006, 19(4): 319-324.
- Gustafson L, Frontal lobe degeneration of non - Alzheimer type. II. Clinical picture and differential diagnosis, *Archives of gerontology and geriatrics*, 1987, 6(3): 209-223.
- Guyant-Maréchal L, Laquerrière A, Duyckaerts C, Dumanchin C, Bou J, Dugny F, Le Ber I, Frébourg T, Hannequin D & Campion D, Valosin - containing protein gene mutations, *Clinical and neuropathological features*, *Neurology*, 2006: 67(4): 644-651.
- Hall H, Farde L, Halldin C, Lundkvist C & Sedvall G, Autoradiographic localization of 5-HT_{2A} receptors in the human brain using [³H]M100907 and [¹¹C]M100907, *Synapse (New York, N.Y.)*, 2000, 38(4): 421-431.
- Hannon J & Hoyer D, Molecular biology of 5-HT receptors, *Behavioural brain research*, 2008, 195(1): 198-213.
- Hardy GH, Mendelian proportions in a mixed population, *Science*, 1908, 28(706): 49-50.
- Harrison P & Goodall AH, "Message in the Platelet" - more than just vestigial mRNA!, *Platelets*, 2008, 19(6): 395-404.
- Harvey JA, Role of the serotonin 5-HT_{2A} receptor in learning, *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 2003, 10(5): 355-362.
- Harvey RJ, Skelton-Robinson M & Rossor MN, The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years, *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 2003, 74(9): 1206-1209.

- Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle F, Morita M, Nakano I, Oda T, Tsuchiya K & Akiyama H, Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis, *Annals of neurology*, 2008, 64(1): 60-70.
- Haubenberger D, Bittner RE, Rauch-Shorny S, Zimprich F, Mannhalter C, Wagner L, Mineva I, Vass K, Auff E & Zimprich A, Inclusion body myopathy and Paget disease is linked to a novel mutation in the *VCP* gene, *Neurology*, 2005, 65(8): 1304-1305.
- Hellems J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F & Vandesompele J, qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data, *Genome Biology*, 2007, 8(2): R19.
- Heptinstall J & Rapley R, Spectrophotometric analysis of nucleic acids, *in: The nucleic Acid Protocols Handbook*, Rapley R, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2000, Cap 11: 57-62.
- Hetzer M, Meyer HH, Walther TC, Bilbao-Cortes D, Warren G & Mattaj JW, Distinct AAA-ATPase p97 complexes function in discrete steps of nuclear assembly, *Nature cell biology*, 2001, 3(12): 1086-1091.
- Heutink P, Stevens M, Rizzu P, Bakker E, Kros JM, Tibben A, Niermeijer MF, van Duijn CM, Oostra BA & van Swieten JC, Hereditary frontotemporal dementia is linked to chromosome 17q21 - q22: a genetic and clinicopathological study of three Dutch families, *Annals of neurology*, 1997, 41(2): 150-159.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS & Griffith R, Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences, *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 1992, 10(4): 413-417.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G & Watson R, Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions, *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 1993, 11(9): 1026-1030.
- Hildebrandt T, Alfano L, Tricamo M & Pfaff DW, Conceptualizing the role of estrogens and serotonin in the development and maintenance of bulimia nervosa, *Clinical psychology review*, 2010, 30(6): 655-668.
- Hodges JR, Davies R, Xuereb J, Kril J & Halliday G, Survival in frontotemporal dementia, *Neurology*, 2003, 61(3): 349-354.
- Holm IE, Englund E, Mackenzie IR, Johannsen P & Isaacs AM, A reassessment of the neuropathology of frontotemporal dementia linked to chromosome 3, *Journal of neuropathology & experimental neurology*, 2007, 66(10): 884-891.
- Holmes C, Arranz M, Collier D, Powell J & Lovestone S, Depression in Alzheimer's disease: the effect of serotonin receptor gene variation, *American journal of medical genetics, Part B: Neuropsychiatric genetics*, 2003, 119B(1): 40-43.
- Holmes C, Arranz MJ, Powell JF, Collier DA & Lovestone S, 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor polymorphisms and psychopathology in late onset Alzheimer's disease, *Human molecular genetics*, 1998, 7(9): 1507-1509.
- Holmes C, Dementia, *Psychiatric disorders*, 2012, 40(11): 628-631.
- Hornung JP, The human raphe nuclei and the serotonergic system, *Journal of chemical neuroanatomy*, 2003, 26(4): 331-343.
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR & Humphrey PP, International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin), *Pharmacological reviews*, 1994, 46(2):157-203.
- Hsieh CL, Bowcock AM, Farrer LA, Hebert JM, Huang KN, Cavalli-Sforza LL, Julius D & Francke U, The serotonin receptor subtype 2 locus *HTR2* is on human chromosome 13 near genes for esterase

- D and retinoblastoma-1 and on mouse chromosome 14, *Somatic cell and molecular genetics*, 1990, 16(6): 567-574.
- Huang C, Zhou H, Tong J, Chen H, Liu YJ, Wang D, Wei X & Xia XG, FUS transgenic rats develop the phenotypes of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration, *PLoS Genetics*, 2011, 7(3): e1002011.
- Humphrey PP, Hartig P & Hoyer D, A proposed new nomenclature for 5-HT receptors, *Trends in pharmacological sciences*, 1993, 14(6): 233-236.
- Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, Pickering-Brown S, Chakraverty S, Isaacs A, Grover A, Hackett J, Adamson J, Lincoln S, Dickson D, Davies P, Petersen RC, Stevens M, de Graaff E, Wauters E, van Baren J, Hillebrand M, Joosse M, Kwon JM, Nowotny P, Che LK, Norton J, Morris JC, Reed LA, Trojanowski J, Basun H, Lannfelt L, Neystat M, Fahn S, Dark F, Tannenberg T, Dodd PR, Hayward N, Kwok JB, Schofield PR, Andreadis A, Snowden J, Craufurd D, Neary D, Owen F, Oostra BA, Hardy J, Goate A, van Swieten J, Mann D, Lynch T & Heutink P, Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17, 1998, *Nature*, 393(6686): 702-705.
- Igaz LM, Kwong LK, Xu Y, Truax AC, Uryu K, Neumann M, Clark CM, Elman LB, Miller BL, Grossman M, McCluskey LF, Trojanowski JQ & Lee VM, Enrichment of C-terminal fragments in TAR DNA-binding protein-43 cytoplasmic inclusions in brain but not in spinal cord of frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis, *The American journal of pathology*, 2008, 173(1): 182-194.
- Ikeda M, Shigenobu K, Fukuhara R, Hokoishi K, Maki N, Nebu A, Komori K & Tanabe H, Efficacy of fluvoxamine as a treatment for behavioral symptoms in frontotemporal lobar degeneration patients, *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 2004, 17(3): 117-121.
- Inayama Y, Yoneda H, Sakai T, Ishida T, Nonomura Y, Kono Y, Takahata R, Koh J, Sakai J, Takai A, Inada Y & Asaba H, Positive association between a DNA sequence variant in the serotonin 2A receptor gene and schizophrenia, *American journal of medical genetics*, 1996, 67(1): 103-105.
- Innis MA & Gelfand DH, Optimization of PCRs, in: PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ & White TJ, Academic Press, Inc., London, 1990, Cap 1: pp 3-12.
- Irwin M, Immune correlation of depression, *Advances in experimental medicine and biology*, 1999, 461: 1-24.
- Jackson M & Lowe J, The new neuropathology of degenerative frontotemporal dementias, *Acta neuropathologica*, 1996, 91(2): 127-134.
- Jernej B, Banović M, Cicin-Sain L, Hranilović D, Baliija M, Oresković D & Folnegović-Smalc V, Physiological characteristics of platelet circulatory serotonin: study on a large human population, *Psychiatry research*, 2000, 94(2): 153-162.
- Johnson JK, Diehl J, Mendez MF, Neuhaus J, Shapira JS, Forman M, Chute DJ, Roberson ED, Pace-Savitsky C, Neumann M, Chow TW, Rosen HJ, Forstl H, Kurz A & Miller BL, Frontotemporal lobar degeneration: demographic characteristics of 353 patients, *Archives of neurology*, 2005, 62(6): 925-930.
- Jorde LB, Watkins WS & Bamshad MJ, Population genomics: A bridge from evolutionary history to genetic medicine, *Human molecular genetics*, 2001, 10(20): 2199-2207.
- Josephs KA, Frontotemporal lobar degeneration, *Neurologic clinics*, 2007, 25(3): 683-696.
- Josephs KA, Hodges JR, Snowden JS, Mackenzie IR, Neumann M, Mann DM & Dickson DW, Neuropathological background of phenotypical variability in frontotemporal dementia, *Acta neuropathologica*, 2011, 122(2): 137-153.

- Josephs KA, Holton JL, Rossor MN, Godbolt AK, Ozawa T, Strand K, Khan N, Al-Sarraj S & Revesz T, Frontotemporal lobar degeneration and ubiquitin immunohistochemistry, *Neuropathology and applied neurobiology*, 2004a, 30(4): 369-373.
- Josephs KA, Jones AG & Dickson DW, Hippocampal sclerosis and ubiquitin - positive inclusions in dementia lacking distinctive histopathology, *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 2004b, 17(4): 342-345.
- Josephs KA, Lin WL, Ahmed Z, Stroh DA, Graff-Radford NR & Dickson DW, Frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive, but TDP-43 - negative inclusions, *Acta neuropathologica*, 2008, 116(2): 159-167.
- Josephs KA, Petersen RC, Knopman DS, Boeve BF, Whitwell JL, Duffy JR, Parisi JE & Dickson DW, Clinicopathologic analysis of frontotemporal and corticobasal degenerations and PSP, *Neurology*, 2006, 66(1): 41-48.
- Jovanovic H, Lundberg J, Karlsson P, Cerin A, Saijo T, Varrone A, Halldin C & Nordström AL, Sex differences in the serotonin 1A receptor and serotonin transporter binding in the human brain measured by PET, *Neuroimage*, 2008, 39(3): 1408-1419.
- Jun E & Mouradian MM, MicroRNAs in neurodegenerative diseases and their therapeutic potential, *Pharmacological therapeutics*, 2012, 133(2): 142-150.
- Jönsson EG, Norton N, Gustavsson JP, Orelund L, Owen MJ & Sedvall GC, A promoter polymorphism in the monoamine oxidase A gene and its relationships to monoamine metabolite concentrations in CSF of healthy volunteers, *Journal of psychiatric research*, 2000, 34(3): 239-244.
- Kabashi E, Lin L, Tradewell ML, Dion PA, Bercier V, Bourguoin P, Rochefort D, Bel Hadj S, Durham HD, Vande Velde C, Rouleau GA & Drapeau P, Gain and loss of function of ALS - related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo, *Human molecular genetics*, 2010, 19(4): 671-683.
- Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, Bouchard JP, Lacomblez L, Pochigaeva K, Salachas F, Pradat PF, Camu W, Meininger V, Dupre N & Rouleau GA, TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis, *Nature Genetics*, 2008, 40(5): 572-574.
- Kent WJ, BLAT - the BLAST - like alignment tool, *Genome research*, 2002, 12(4): 656-664.
- Kertesz A, Kawarai T, Rogava E, St George-Hyslop P, Poorkaj P, Bird TD & Munoz DG, Familial frontotemporal dementia with ubiquitin - positive, tau - negative inclusions, *Neurology*, 2000, 54(4): 818-827.
- Kertesz A, McMonagle P, Blair M, Davidson W & Munoz DG, The evolution and pathology of frontotemporal dementia, 2005, *Brain*, 128(Pt 9): 1996-2005.
- Kertesz A, Morlog D, Light M, Blair M, Davidson W, Jesso S & Brashear R, Galantamine in frontotemporal dementia and primary progressive aphasia, *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 2008, 25(2): 178-185.
- Kheterpal I & Mathies RA, Capillary array electrophoresis DNA sequencing, *Analytical chemistry*, 1999, 71(1): 31A-37A.
- Kimonis VE & Watts DJ, Autosomal dominant inclusion body myopathy, Paget disease of bone, and frontotemporal dementia, *Alzheimer disease and associated disorders*, 2005, Suppl 1: S44-S47.
- Kimonis VE, Fulchiero E, Vesa J & Watts G, VCP disease associated with myopathy, Paget disease of bone and frontotemporal dementia: review of a unique disorder, *Biochimica et biophysica acta*, 2008, 1782(12): 744-748.
- Klepárník K & Boček P, DNA Diagnostics by capillary electrophoresis, *Chemical reviews*, 2007, 107(11): 5279-5317.

- Knopman DS & Roberts RO, Estimating the number of persons with frontotemporal lobar degeneration in the US population, *Journal of molecular neuroscience*, 2011, 45(3): 330-335.
- Knopman DS, Petersen RC, Edland SD, Cha RH & Rocca WA, The incidence of frontotemporal lobar degeneration in Rochester, Minnesota, 1990 through 1994, *Neurology*, 2004, 62(3): 506-508.
- Komar AA, Silent SNPs: impact on gene function and phenotype, *Pharmacogenomics*, 2007, 8(8): 1075-1080.
- Kondo H, Rabouille C, Newman R, Levine TP, Pappin D, Freemont P & Warren G, p47 is a cofactor for p97 - mediated membrane fusion, *Nature*, 1997, 388(6637): 75-78.
- Kovach MJ, Waggoner B, Leal SM, Gelber D, Khardori R, Levenstien MA, Shanks CA, Gregg G, Al-Lozi MT, Miller T, Rakowicz W, Lopate G, Florence J, Glosser G, Simmons Z, Morris JC, Whyte MP, Pestronk A & Kimonis VE, Clinical delineation and localization to chromosome 9p13.3 - p12 of a unique dominant disorder in four families: hereditary inclusion body myopathy, Paget disease of bone, and frontotemporal dementia, *Molecular genetics and metabolism*, 2001, 74(4): 458-475.
- Kovacs GG, Murrell JR, Horvath S, Haraszti L, Majtenyi K, Molnar MJ, Budka H, Ghetti B & Spina S, TARDBP variation associated with frontotemporal dementia, supranuclear gaze palsy, and chorea, *Movement disorders*, 2009, 4(12): 1843-1847.
- Kovar H, Dr. Jekyll and Mr. Hyde: The two faces of the FUS/EWS/TAF15 protein family, *Sarcoma*, 2011, 2011: 837474.
- Kroll MH & Schafer AI, Biochemical mechanisms of platelet activation, *Blood*, 1989, 74(4): 1181-1195.
- Kubera M, Maes M, Kenis G, Kim YK & Lasoń W, Effects of serotonin and serotonergic agonists and antagonists on the production of tumor necrosis factor α and interleukin-6, *Psychiatry research*, 2005, 134(3): 251-258.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A & Zoric N, The real-time polymerase chain reaction, *Molecular aspects of medicine*, 2006, 27(2-3): 95-125.
- Kubista M, Rusnakova V, Svec D, Sjögreen B & Tichopad A, GenEx: Data analysis software, in: Quantitative real-time PCR in applied microbiology, Filion M, Caister academic press, Norfolk, United Kingdom, 2012, Part I, Cap 4: pp 63-84.
- Kuemmerle JF, Murthy KS, Grider JR, Martin DC & Makhlof GM, Coexpression of 5-HT_{2A} and 5-HT₄ receptors coupled to distinct signaling pathways in human intestinal muscle cells, *Gastroenterology*, 1995, 109(6): 1791-1800.
- Kumar-Singh S & Van Broeckhoven C, Frontotemporal lobar degeneration: current concepts in the light of recent advances, *Brain pathology*, 2007, 17(1): 104-114.
- Kuppuswamy MN, Hoffmann JW, Kasper CK, Spitzer SG, Groce SL & Bajaj SP, Single nucleotide primer extension to detect genetic diseases: experimental application to hemophilia B (factor IX) and cystic fibrosis genes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(4): 1143-1147.
- Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, Valdmanis P, Rouleau GA, Hosler BA, Cortelli P, de Jong PJ, Yoshinaga Y, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yan J, Ticozzi N, Siddique T, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Horvitz HR, Landers JE & Brown RH Jr., Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis, *Science*, 2009, 323(5918): 1205-1208.
- Laaksovirta H, Peuralinna T, Schymick JC, Scholz SW, Lai SL, Myllykangas L, Sulkava R, Jansson L, Hernandez DG, Gibbs JR, Nalls MA, Heckerman D, Tienari PJ & Traynor BJ, Chromosome 9p21 in amyotrophic lateral sclerosis in Finland: a genome - wide association study, *Lancet Neurology*, 2010, 9(10): 978-985.

- Lai MK, Tsang SW, Alder JT, Keene J, Hope T, Esiri MM, Francis PT & Chen CP, Loss of serotonin 5-HT_{2A} receptors in the postmortem temporal cortex correlates with rate of cognitive decline in Alzheimer's disease, *Psychopharmacology*, 2005, 179(3): 673-677.
- Lam LC, Tang NL, Ma SL, Zhang W & Chiu HF, 5-HT_{2A} T102C receptor polymorphism and neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease, *International journal of geriatric psychiatry*, 2004, 19(6): 523-526.
- Lander ES, The new genomics: global views of biology, *Science*, 1996, 274(5287): 536-539.
- Landry P, Plante I, Ouellet DL, Perron MP, Rousseau G & Provost P, Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets, *Natural structural & molecular biology*, 2009, 16(9): 961-966.
- Laurin N, Brown JP, Morissette J & Raymond V, Recurrent mutation of the gene encoding sequestosome 1 (SQSTM1/p62) in Paget disease of bone, *American journal of human genetics*, 2002, 70(6): 1582-1588.
- Law WJ, Cann KL & Hicks GG, TLS, EWS and TAF15: a model for transcriptional integration of gene expression, *Briefings in functional genomics & proteomics*, 2006, 5(1): 8-14.
- Le Ber I, Camuzat A, Berger E, Hannequin D, Laquerrière A, Golfier V, Seilhean D, Viennet G, Couratier P, Verpillat P, Heath S, Camu W, Martinaud O, Lacomblez L, Vercelletto M, Salachas F, Sellal F, Didic M, Thomas-Anterion C, Puel M, Michel BF, Besse C, Duyckaerts C, Meininger V, Campion D, Dubois B, Brice A & French Research Network on FTD/FTD-MND, Chromosome 9p-linked families with frontotemporal dementia associated with motor neuron disease, *Neurology*, 2009, 72(19): 1669-1676.
- Le Ber I, Camuzat A, Guerreiro R, Bouya-Ahmed K, Bras J, Nicolas G, Gabelle A, Didic M, De Septenville A, Millecamps S, Lenglet T, Latouche M, Kabashi E, Campion D, Hannequin D, Hardy J, Brice A & for the French Clinical and Genetic Research Network on FTD/FTD-ALS, SQSTM1 Mutations in French Patients With Frontotemporal Dementia or Frontotemporal Dementia With Amyotrophic Lateral Sclerosis, *JAMA neurology*, 2013, 70(11): 1403-1410.
- Le Ber I, Camuzat A, Hannequin D, Pasquier F, Guedj E, Rovelet-Lecrux A, Hahn-Barma V, van der Zee J, Clot F, Bakchine S, Puel M, Ghanim M, Lacomblez L, Mikol J, Deramecourt V, Lejeune P, de la Sayette V, Belliard S, Vercelletto M, Meyrignac C, Van Broeckhoven C, Lambert JC, Verpillat P, Campion D, Habert MO, Dubois B, Brice A & French research network on FTD/FTD-MND, Phenotype variability in progranulin mutation carriers: a clinical, neuropsychological, imaging and genetic study, *Brain*, 2008, 131(Pt 3): 732-746.
- Le Ber I, van der Zee J, Hannequin D, Gijssels I, Campion D, Puel M, Laquerrière A, De Pooter T, Camuzat A, Van den Broeck M, Dubois B, Sellal F, Lacomblez L, Vercelletto M, Thomas-Anterion C, Michel BF, Golfier V, Didic M, Salachas F, Duyckaerts C, Cruts M, Verpillat P, Van Broeckhoven C, Brice A & French Research Network on FTD/FTD-MND, Progranulin null mutations in both sporadic and familial frontotemporal dementia, *Human mutation*, 2007, 28(9): 846-855.
- Lebert F & Pasquier F, Trazodone in the treatment of behavior in frontotemporal dementia, *Human psychopharmacology: clinical and experimental*, 1999, 14(4): 279-281.
- Lendon CL, Lynch T, Norton J, McKeel DW Jr, Busfield F, Craddock N, Chakraverty S, Gopalakrishnan G, Shears SD, Grimmett W, Wilhelmsen KC, Hansen L, Morris JC & Goate AM, Hereditary dysphasic disinhibition dementia: a frontotemporal dementia linked to 17q21 - 22, *Neurology*, 1998, 50(6): 1546-1555.
- Lewis CM & Knight J, Introduction to genetic association studies, *Cold spring harbor protocols*, 2012, 2012(3): 297-306.
- life technologies™, TaqMan® Array Plates, User guide, Life Technologies Corporation, 2011, pp 7-23.

- life technologies™, TURBO DNA-free™ Kit, TURBO™ DNase Treatment and Removal Reagents, User guide, Life Technologies Corporation, California, USA, 2012, pp 1-6.
- Lindemann S, Tolley ND, Eyre JR, Kraiss LW, Mahoney TM & Weyrich AS, Integrins regulate the intracellular distribution of eukaryotic initiation factor 4E in platelets. A checkpoint for translational control, *The journal of biological chemistry*, 2001, 276(36): 33947-33951.
- Lindquist SG, Braedgaard H, Svenstrup K, Isaacs AM, Nielsen JE & FReJA Consortium, Frontotemporal dementia linked to chromosome 3 (FTD-3) - current concepts and the detection of a previously unknown branch of the Danish FTD-3 family, *European journal of neurology*, 2008, 15(7): 667-670.
- Lipton AM, White CL 3rd & Bigio EH, Frontotemporal lobar degeneration with motor neuron disease - type inclusions predominates in 76 cases of frontotemporal degeneration, *Acta neuropathologica*, 2004, 108(5): 379-385.
- Lladó A, Sánchez-Valle R, Rey MJ, Ezquerra M, Tolosa E, Ferrer I, Molinuevo JL & Catalan collaborative Study Group for FLTD, Clinicopathological and genetic correlates of frontotemporal lobar degeneration and corticobasal degeneration, *Journal of neurology*, 2008, 255(4): 488-494.
- Lo HS, Wang Z, Hu Y, Yang HH, Gere S, Buetow KH & Lee MP, Allelic Variation in Gene Expression Is Common in the Human Genome, *Genome research*, 2003, 13(8): 1855-1862.
- Lübeck PS & Hoorfar J, PCR Technology and Applications to Zoonotic Food - Borne Bacterial Pathogens, in: PCR Detection of Microbial Pathogens, Methods in Molecular Biology™, Sachse K & Frey J, Humana Press, Totowa, NJ, 2003, Vol. 216, Part I, Cap 4: pp 65-84.
- Lucki I, The spectrum of behaviors influenced by serotonin, *Biological psychiatry*, 1998, 44(3): 151-162.
- Luty AA, Kwok JB, Thompson EM, Blumbergs P, Brooks WS, Loy CT, Dobson-Stone C, Panegyres PK, Hecker J, Nicholson GA, Halliday GM & Schofield PR, Pedigree with frontotemporal lobar degeneration-motor neuron disease and Tar DNA binding protein-43 positive neuropathology: genetic linkage to chromosome 9, *BMC neurology*, 2008, 8: 32.
- Ma H, Shieh KJ, Chen G, Qiao XT & Chuang MY, Application of Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), *The Journal of American Science*, 2006, 2(3): 1-15.
- Macaulay IC, Carr P, Gusnanto A, Ouwehand WH, Fitzgerald Des & Watkins NA, Platelet genomics and proteomics in human health and disease, *The journal of clinical investigation*, 2005, 115(12): 3370-3377.
- Mackenzie IR, Baker M, West G, Woulfe J, Qadi N, Gass J, Cannon A, Adamson J, Feldman H, Lindholm C, Melquist S, Pettman R, Sadovnick AD, Dwosh E, Whiteheart SW, Hutton M & Pickering-Brown SM, A family with tau - negative frontotemporal dementia and neuronal intranuclear inclusions linked to chromosome 17, *Brain*, 2006, 129(Pt 4): 853-867.
- Mackenzie IR, Bigio EH, Ince PG, Geser F, Neumann M, Cairns NJ, Kwong LK, Forman MS, Ravits J, Stewart H, Eisen A, McClusky L, Kretschmar HA, Monoranu CM, Highley JR, Kirby J, Siddique T, Shaw PJ, Lee VM & Trojanowski JQ, Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD-1 mutations, *Annals of neurology*, 2007, 61(5): 427-434.
- Mackenzie IR, Foti D, Woulfe J & Hurwitz TA, Atypical frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin - positive, TDP-43 - negative neuronal inclusions, *Brain*, 2008, 131(Pt 5): 1282-1293.
- Mackenzie IR, Neumann M, Barborie A, Sampathu DM, Du Plessis D, Jaros E, Perry RH, Trojanowski JQ, Mann DM & Lee VM, A harmonized classification system for FTLD-TDP pathology, *Acta neuropathologica*, 2011, 122(1): 111-113.
- Mackenzie IR, Neumann M, Bigio EH, Cairns NJ, Alafuzoff I, Kril J, Kovacs GG, Ghetti B, Halliday G, Holm IE, Ince PG, Kamphorst W, Revesz T, Rozemuller AJ, Kumar-Singh S, Akiyama H, Barborie

- A, Spina S, Dickson DW, Trojanowski JQ & Mann DM, Nomenclature for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: consensus recommendations, *Acta neuropathologica*, 2009, 117(1): 15-18.
- Mackenzie IR, Neumann M, Bigio EH, Cairns NJ, Alafuzoff I, Kril J, Kovacs GG, Ghetti B, Halliday G, Holm IE, Ince PG, Kamphorst W, Revesz T, Rozemuller AJ, Kumar-Singh S, Akiyama H, Baborie A, Spina S, Dickson DW, Trojanowski JQ & Mann DM, Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update, *Acta neuropathologica*, 2010, 119(1): 1-4.
- Maes M, Bosmans E, Calabrese J, Smith R & Meltzer HY, Interleukin-2 and interleukin-6 in schizophrenia and mania: effects of neuroleptics and mood stabilizers, *Journal of psychiatric research*, 1995a, 29(2): 141-152.
- Maes M, Meltzer HY, Bosmans E, Bergmans R, Vandoolaeghe E, Ranjan R & Desnyder R, Increased plasma concentration of interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor, soluble interleukin-2 receptor and transferring receptor in major depression, *Journal of affective disorders*, 1995b, 34(4): 301-309.
- Makridakis NM & Reichardt JK, Multiplex automated primer extension analysis: simultaneous genotyping of several polymorphisms, *BioTechniques*, 2001, 31(6): 1374-1380.
- Mandelli L, Mazza M, Di Nicola M, Martinotti G, Tavian D, Colombo E, Missaglia S, Negri G, De Ronchi D, Colombo R, Janiri L & Serretti A, Serotonergic and dopaminergic genes in bipolar disorder and response to treatments in bipolar depression. Investigation on a well - characterized naturalistic sample, *Clinical neuropsychiatry*, 2011, 8(5): 295-300.
- Marangos PJ, Campbell IC, Schmechel DE, Murphy DL & Goodwin FK, Blood platelets contain a neuron - specific enolase subunit, *Journal of neurochemistry*, 1980, 34(5): 1254-1258.
- Matoulkova E, Michalova E, Vojtesek B & Hrstka R, The role of the 3' untranslated region in post - transcriptional regulation of protein in mammalian cells, *RNA biology*, 2012, 9(5): 563-576.
- McKhann GM, Albert MS, Grossman M, Miller B, Dickson D & Trojanowski JQ, Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease, *Archives of neurology*, 2001, 58(11): 1803-1809.
- McMurtray A, Clark DG, Christine D & Mendez MF, Early-onset dementia: frequency and causes compared to late-onset dementia, *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 2006, 21(2): 56-64.
- McRedmond JP, Park SD, Reilly DF, Coppinger JA, Maguire PB, Shields DC & Fitzgerald DJ, Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelet proteins and platelet - specific genes, *Molecular & cell proteomics*, 2004, 3(2): 133-144.
- Mendez MF, Shapira JS, McMurtray A & Licht E, Preliminary findings: behavioral worsening on donepezil in patients with frontotemporal dementia, *The American journal of geriatric psychiatry*, 2007, 15(1): 84-87.
- Mercy L, Hodges JR, Dawson K, Barker RA & Brayne C, Incidence of early - onset dementias in Cambridgeshire, United Kingdom, *Neurology*, 2008, 71(19): 1496-1499.
- Metzker ML, Emerging technologies in DNA sequencing, *Genome Research*, 2005, 15(12): 1767-1776.
- Meyer HH, Shorter JG, Seemann J, Pappin D & Warren G, A complex of mammalian ufd1 and npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways, *The EMBO journal*, 2000, 19(10): 2181-2192.
- Mignone F, Gissi C, Liuni S & Pesole G, Untranslated regions of mRNAs, *Genome biology*, 2002, 3(3): 1-10.
- Milani L, Lundmark A, Nordlund J, Kiialainen A, Flaegstad T, Jonmundsson G, Kanerva J, Schmiegelow K, Gunderson KL, Lönnnerholm G & Syvänen AC, Allele - specific gene expression patterns in

- primary leukemic cells reveal regulation of gene expression by CpG site methylation, *Genome research*, 2009, 19(1): 1-11.
- Miller BL, Darby AL, Swartz JR, Yener GG & Mena I, Dietary changes, compulsions and sexual behavior in frontotemporal degeneration, *Dementia (Basel, Switzerland)*, 1995, 6(4): 195-199.
- Momeni P, Rogaeva E, Van Deerlin V, Yuan W, Grafman J, Tierney M, Huey E, Bell J, Morris CM, Kalaria RN, van Rensburg SJ, Niehaus D, Potocnik F, Kawarai T, Salehi-Rad S, Sato C, St. George-Hyslop P & Hardy J, Genetic variability in CHMP2B and frontotemporal dementia, *Neurodegenerative diseases*, 2006, 3(3): 129-133.
- Moore D, Preparation and Analysis of DNA, *in: Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG & Smith JA, Struhl K (eds), John Wiley & Sons, 1997, Cap 2: pp 2.0.1 - 2.1.9.
- Moretti R, Torre P, Antonello RM, Cattaruzza T, Cazzato G & Bava A, Rivastigmine in frontotemporal dementia: an open - label study, *Drugs & aging*, 2004, 21(14): 931-937.
- Moretti R, Torre P, Antonello RM, Cazzato G & Bava A, Frontotemporal dementia: paroxetine as a possible treatment of behavior symptoms. A randomized, controlled, open 14 - month study, *European neurology*, 2003, 49(1): 13-19.
- Morita M, Al-Chalabi A, Andersen PM, Hosler B, Sapp P, Englund E, Mitchell JE, Habgood JJ, de Bellerocche J, Xi J, Jongjaroenprasert W, Horvitz HR, Gunnarsson LG & Brown RH Jr., A locus on chromosome 9p confers susceptibility to ALS and frontotemporal dementia, *Neurology*, 2006, 66(6): 839-844.
- Motulsky HJ, Analysing Data with GraphPad Prism, GraphPad Software Inc., San Diego CA, 1999, www.graphpad.com.
- Muck-Seler D, Presecki P, Mimica N, Mustapic M, Pivac N, Babic A, Nedic G & Folnegovic-Smalc V, Platelet serotonin concentration and monoamine oxidase type B activity in female patients in early, middle and late phase of Alzheimer's disease, *Progress in neuro - psychopharmacol & biological psychiatry*, 2009, 33(7): 1226-1231.
- Mueller O, Lightfoot S & Schroeder A, RNA Integrity Number (RIN) - standardization of RNA quality control, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany, 2004, pp 1-8.
- Mukherjee O, Pastor P, Cairns NJ, Chakraverty S, Kauwe JS, Shears S, Behrens MI, Budde J, Hinrichs AL, Norton J, Levitch D, Taylor-Reinwald L, Gitcho M, Tu PH, Tenenholz Grinberg L, Liscic RM, Armendariz J, Morris JC & Goate AM, HDDD2 is a familial frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin - positive, tau negative inclusions caused by a missense mutation in the signal peptide of progranulin, *Annals of neurology*, 2006, 60(3): 314-322.
- Mukherjee O, Wang J, Gitcho M, Chakraverty S, Taylor-Reinwald L, Shears S, Kauwe JS, Norton J, Levitch D, Bigio EH, Hatanpaa KJ, White CL, Morris JC, Cairns NJ & Goate A, Molecular characterization of novel progranulin (*GRN*) mutations in frontotemporal dementia, *Human mutation*, 2008, 29(4): 512-521.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G & Erlich H, Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 1986, 51(Pt 1): 263-273.
- Mullis KB & Faloona FA, Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase - catalyzed chain reaction, *Methods in enzymology*, 1987, 155: 335-350.
- Mullis KB, The unusual origin of the polymerase chain reaction, *Scientific American*, 1990, 262(4): 56-61, 64-65.
- Murrell JR, Koller D, Foroud T, Goedert M, Spillantini MG, Edenberg HJ, Farlow MR & Ghetti B, Familial multiple - system tauopathy with presenile dementia is localized to chromosome 17, *American journal of human genetics*, 1997, 61(5): 1131-1138.

- Myers RL, Airey DC, Manier DH, Shelton RC & Sanders-Bush E, Polymorphisms in the regulatory region of the human serotonin 5-HT_{2A} receptor gene (*HTR2A*) influence gene expression, *Biological Psychiatry*, 2007, 61(2): 167-173.
- Nacmias B, Tedde A, Forleo P, Piacentini S, Guarnieri BM, Bartoli A, Ortenzi L, Petruzzi C, Serio A, Marcon G & Sorbi S, Association between 5-HT_{2A} receptor polymorphism and psychotic symptoms in Alzheimer's disease, *Biological psychiatry*, 2001, 50(6): 472-475.
- Nagalla S, Shaw C, Kong X, Kondkar AA, Edelstein LC, Ma L, Chen J, McKnight GS, López JA, Yang L, Jin Y, Bray MS, Leal SM, Dong JF & Bray PF, Platelet microRNA - mRNA coexpression profiles correlate with platelet reactivity, *Blood*, 2011, 117(19): 5189-5197.
- Neary D, Snowden J & Mann D, Frontotemporal dementia, *Lancet neurology*, 2005, 4(11): 771-780.
- Neary D, Snowden JS, Gustafson L, Passant U, Stuss D, Black S, Freedman M, Kertesz A, Robert PH, Albert M, Boone K, Miller BL, Cummings J & Benson DF, Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria, *Neurology*, 1998, 51(6): 1546-1554.
- Neary D, Snowden JS, Northen B & Goulding P, Dementia of frontal lobe type, *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 1988, 51(3): 353-361.
- Neumann M, Bentmann E, Dormann D, Jawaid A, DeJesus-Hernandez M, Ansorge O, Roeber S, Kretschmar HA, Munoz DG, Kusaka H, Yokota O, Ang LC, Bilbao J, Rademakers R, Haass C & Mackenzie IR, FET proteins TAF15 and EWS are selective markers that distinguish FTLD with FUS pathology from amyotrophic lateral sclerosis with FUS mutations, *Brain*, 2011, 134(Pt 9): 2595-2609.
- Neumann M, Mackenzie IR, Cairns NJ, Boyer PJ, Markesbery WR, Smith CD, Taylor JP, Kretschmar HA, Kimonis VE & Forman MS, TDP-43 in the ubiquitin pathology of frontotemporal dementia with VCP gene mutations, *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 2007, 66(2): 152-157.
- Neumann M, Rademakers R, Roeber S, Baker M, Kretschmar HA & Mackenzie IR, A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology, *Brain*, 2009, 132(Pt 11): 2922-2931.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretschmar HA, Trojanowski JQ & Lee VM, Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis, *Science*, 2006, 314(5796): 130-133.
- Ni W & Watts SW, 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT), *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 2006, 33(7): 575-583.
- Nichols DE & Nichols CD, Serotonin receptors, *Chemical reviews*, 2008, 108(5): 1614-1641.
- Nishizawa S, Benkelfat C, Young SN, Leyton M, Mzengeza S, de Montigny C, Blier P & Diksic M, Differences between males and females in rates of serotonin synthesis in human brain, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(10): 5308-5313.
- Nolan T, Hands RE & Bustin SA, Quantification of mRNA using real-time RT-PCR, *Nature protocols*, 2006, 1(3): 1559-1582.
- Norton N & Owen MJ, *HTR2A*: association and expression studies in neuropsychiatric genetics, *Annals of Medicine*, 2005, 37(2): 121-129.
- Onari K & Spatz H, Anatomische Beiträge zur Lehre von der Pickschen umschriebenen Grosshirnrinden - Atrophie ("Picksche Krankheit"), *Zeitschrift für die gesamte neurologie und psychiatrie*, 1926, 101: 470-511.
- Osman A & Fälker K, Characterization of human platelet microRNA by quantitative PCR coupled with an annotation network for predicted target genes, *Platelets*, 2011, 22(6): 433-441.

- Ostrowitzki S, Rao M, Rédei J & Andres A, Concurrence of cortex and platelet serotonin₂ receptor binding characteristics in the individual and the putative regulation by serotonin, *Journal of neural transmission (General section)*, 1993, 93(1): 27-35.
- Ota M, Fukushima H, Kulski JK & Inoko H, Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, *Nature Protocols*, 2007, 2(11): 2857-2864.
- Pabla R, Weyrich SA, Dixon DA, Bray PF, McIntyre TM, Prescottand SM & Zimmerman GA, Integrin - dependent control of translation: engagement of integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ regulates synthesis of proteins in activated human platelets, *The journal of cell biology*, 1999, 144(1): 175-184.
- Pal JK, Chatterjee S & Berwal SK, Pathological variations in 3'-untranslated regions of human genes, *in: Encyclopedia of life sciences (ELS)*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2010.
- Pardridge WM & Oldendorf WH, Kinetic analysis of blood - brain barrier transport of amino acids, *Biochimica et biophysica acta*, 1975, 401(1): 128-136.
- Parkinson N, Ince PG, Smith MO, Highley R, Skibinski G, Andersen PM, Morrison KE, Pall HS, Hardiman O, Collinge J, Shaw PJ, Fisher EM, MRC Proteomics in ALS Study & FReJA Consortium, ALS phenotypes with mutations in *CHMP2B* (charged multivesicular body protein 2B), *Neurology*, 2006, 67(6): 1074-1077.
- Pasternak JJ, *The Molecular Biology of the Gene*, *in: An introduction to Human Molecular Genetics, Mechanisms of Inherited Diseases*, Second Edition, Pasternak JJ, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, 2005, Cap 4: pp 95-100.
- Pastinen T, Ge B & Hudson TJ, Influence of human genome polymorphism on gene expression, *Human molecular genetics*, 2006, Spec No 1: R9-R16.
- Pastinen T, Kurg A, Metspalu A, Peltonen L & Syvänen AC, Minisequencing: a specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays, *Genome research*, 1997, 7(6): 606-614.
- Pastinen T, Partanen J & Syvänen AC, Multiplex, fluorescent, solid - phase minisequencing for efficient screening of DNA sequence variation, *Clinical chemistry*, 1996, 42(9): 1391-1397.
- Pastinen T, Sladek R, Gurd S, Sammak A, Ge B, Lepage P, Lavergne K, Villeneuve A, Gaudin T, Brändström H, Beck A, Verner A, Kingsley J, Harmsen E, Labuda D, Morgan K, Vohl MC, Naumova AK, Sinnott D & Hudson TJ, A survey of genetic and epigenetic variation affecting human gene expression, *Physiological genomics*, 2004, 16(2): 184-193.
- Pernecky R, Diehl-Schmid J, Förstl H, Drzezga A & Kurz A, Male gender is associated with greater cerebral hypometabolism in frontotemporal dementia: evidence for sex - related cognitive reserve, *International journal of geriatric psychiatry*, 2007, 22(11): 1135-1140.
- Perrotti D, Bonatti S, Trotta R, Martinez R, Skorski T, Salomoni P, Grassilli E, Lozzo RV, Cooper DR & Calabretta B, TLS/FUS, a pro - oncogene involved in multiple chromosomal translocations, is a novel regulator of BCR/ABL - mediated leukemogenesis, *The EMBO journal*, 1998, 17(15): 4442-4455.
- Pesole G, Grillo C, Larizza A & Liuni S, The untranslated regions of eukaryotic mRNAs: structure, function, evolution and bioinformatic tools for their analysis, *Briefings in bioinformatics*, 2000, 1(3): 236-249.
- Pick A, Über die beziehungen der senilen Hirnatrophie zur Aphasie, *Prager medicinische wochenschrift*, 1892, 17(16): 165-167.
- Pick A, Über einen weiteren Symptomenkomplex im Rahmen der Dementia senilis, bedingt durch umschriebene stärkere Hirnatrophie (gemischte Apraxie), *Monatsschrift für psychiatrie und neurologie*, 1906, 19(2): 97-108.

- Pickering-Brown SM, Baker M, Gass J, Boeve BF, Loy CT, Brooks WS, Mackenzie IR, Martins RN, Kwok JB, Halliday GM, Kril J, Schofield PR, Mann DM & Hutton M, Mutations in progranulin explain atypical phenotypes with variants in MAPT, *Brain*, 2006, 129(Pt 11): 3124-3126.
- Pickering-Brown SM, The complex aetiology of frontotemporal lobar degeneration, *Experimental neurology*, 2007, 206(1): 1-10.
- Piggee CA, Muth J, Carrilho E & Karger BL, Capillary electrophoresis for the detection of known point mutations by single - nucleotide primer extension and laser - induced fluorescence detection, *Journal of chromatography A.*, 1997, 781(1-2): 367-375.
- Pikkarainen M, Hartikainen P & Alafuzoff I, Neuropathologic features of frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin - positive inclusions visualized with ubiquitin - binding protein p62 immunohistochemistry, *Journal of neuropathology & experimental neurology*, 2008, 67(4): 280-298.
- Plé H, Landry P, Benham A, Coarfa C, Gunaratne PH & Provost P, The repertoire and features of human platelet microRNAs, *PLoS ONE*, 2012, 7(12): e50746.
- Pleasure IT, Black MM & Keen JH, Valosin - containing protein, VCP, is a ubiquitous clathrin - binding protein, *Nature*, 1993, 365(6445): 459-462.
- Pletscher A, Platelets as models: use and limitations, *Experimentia*, 1988, 44(2): 152-155.
- Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, Nemens E, Garruto RM, Anderson L, Andreadis A, Wiederholt WC, Raskind M & Schellenberg GD, Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia, *Annals of neurology*, 1998, 43(6): 815-825.
- Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA & Baumeister K, A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain - terminating dideoxynucleotides, *Science*, 1987, 238(4825): 336-341.
- Procter AW, Qurne M & Francis PT, Neurochemical features of frontotemporal dementia, *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 1999, Suppl 1: 80-84.
- Qiagen, RNeasy[®] Mini Handbook, QIAGEN, 2010, pp 9-30.
- Quan N & Herkenham M, Connecting cytokines and brain: a review of current issues, *Histology and histopathology*, 2002, 17(1): 273-288.
- Rabinovich E, Kerem A, Fröhlich KU, Diamant N & Bar-Nun S, AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum - associated protein degradation, *Molecular and cellular biology*, 2002, 22(2): 626-634.
- Rabinovici GD & Miller BL, Frontotemporal lobar degeneration: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and management, *CNS drugs*, 2010, 24(5): 375-398.
- Rabouille C, Kondo H, Newman R, Hui N, Freemont P & Warren G, Syntaxin 5 is a common component of the NSF - and p97 - mediated reassembly pathways of Golgi cisternae from mitotic Golgi fragments in vitro, *Cell*, 1998, 92(5): 603-610.
- Rademakers R, Cruts M, Dermaut B, Sleegers K, Rosso SM, Van den Broeck M, Backhovens H, van Swieten J, van Duijn CM & Van Broeckhoven C, Tau negative frontal lobe dementia at 17q21: significant finemapping of the candidate region to a 4.8 cM interval, *Molecular psychiatry*, 2002, 7(10): 1064-1074.
- Rademakers R, Eriksen JL, Baker M, Robinson T, Ahmed Z, Lincoln SJ, Finch N, Rutherford NJ, Crook RJ, Josephs KA, Boeve BF, Knopman DS, Petersen RC, Parisi JE, Caselli RJ, Wszolek ZK, Uitti RJ, Feldman H, Hutton ML, Mackenzie IR, Graff-Radford NR & Dickson DW, Common variation in the miR-659 binding - site of GRN is a major risk factor for TDP43-positive frontotemporal dementia, *Human molecular genetics*, 2008, 17(23): 3631-3642.

- Rana BK, Shiina T & Insel PA, Genetic variations and polymorphisms of G protein - coupled receptors: functional and therapeutic implications, *Annual review of pharmacology and toxicology*, 2001, 41: 593-624.
- Rapport MM, Green AA & Page IH, Crystalline Serotonin, *Science*, 1948a, 108(2804): 329-330.
- Rapport MM, Green AA & Page IH, Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum, *The Journal of biological chemistry*, 1948b, 174 (2): 735-741.
- Rapport MM, Green AA & Page IH, Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization, *The Journal of Biological Chemistry*, 1948c, 176 (3): 1243-1251.
- Rapport MM, Serum vasoconstrictor (serotonin) the presence of creatinine in the complex; a proposed structure of the vasoconstrictor principle, *The Journal of biological chemistry*, 1949, 180(3): 961-969.
- Rascovsky K, Hodges JR, Kipps CM, Johnson JK, Seeley WW, Mendez MF, Knopman D, Kertesz A, Mesulam M, Salmon DP, Galasko D, Chow TW, DeCarli C, Hillis A, Josephs K, Kramer JH, Weintraub S, Grossman M, Gorno-Tempini ML & Miller B, Diagnostic criteria for the behavioral variant of frontotemporal dementia (bvFTD): current limitations and future directions, *Alzheimer disease and associated disorders*, 2007, 21(4): S14-S18.
- Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D, Mendez MF, Kramer JH, Neuhaus J, van Swieten JC, Seelaar H, Dopper EG, Onyike CU, Hillis AE, Josephs KA, Boeve BF, Kertesz A, Seeley WW, Rankin KP, Johnson JK, Gorno-Tempini ML, Rosen H, Prigleau-Latham CE, Lee A, Kipps CM, Lillo P, Piguet O, Rohrer JD, Rossor MN, Warren JD, Fox NC, Galasko D, Salmon DP, Black SE, Mesulam M, Weintraub S, Dickerson BC, Diehl-Schmid J, Pasquier F, Deramecourt V, Lebert F, Pijnenburg Y, Chow TW, Manes F, Grafman J, Cappa SF, Freedman M, Grossman M & Miller BL, Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia, *Brain*, 2011, 134(Pt 9): 2456-2477.
- Rasmussen HB, Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR - amplified fragments (PCR-RFLP) and gel electrophoresis - Valuable tool for genotyping and genetic fingerprint, *in: Gel electrophoresis - Principles and basics*, Magdeldin S, InTech, Europe, ISBN: 978-953-51-0458-2, 2012, Cap 18: pp 315-316.
- Ratnavalli E, Brayne C, Dawson K & Hodges JR, The prevalence of frontotemporal dementia, *Neurology*, 2002, 58(11): 1615-1621.
- Raymond JR, Turner JH, Gelasco AK, Ayiku HB, Coaxum SD, Arthur JM & Garnovskaya MN, 5-HT receptor signal transduction pathways, *in: The Serotonin receptors, From molecular pharmacology to human therapeutics*, Roth BL, Humana Press, Inc, NJ, USA, 2006, Cap 5: pp 143-206.
- Reed LA, Wszolek ZK & Hutton M, Phenotypic correlations in FTDP-17, *Neurobiology of aging*, 2001, 22(1): 89-107.
- Reich DE, Cargill M, Bolk S, Ireland J, Sabeti PC, Richter DJ, Lavery T, Kouyoumjian R, Farhadian SF, Ward R & Lander ES, Linkage disequilibrium in the human genome, *Nature*, 2001, 411(6834): 199-204.
- Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, Schymick JC, Laaksovirta H, van Swieten JC, Myllykangas L, Kalimo H, Paetau A, Abramzon Y, Remes AM, Kaganovich A, Scholz SW, Duckworth J, Ding J, Harmer DW, Hernandez DG, Johnson JO, Mok K, Ryten M, Trabzuni D, Guerreiro RJ, Orrell RW, Neal J, Murray A, Pearson J, Jansen IE, Sondervan D, Seelaar H, Blake D, Young K, Halliwell N, Callister JB, Toulson G, Richardson A, Gerhard A, Snowden J, Mann D, Neary D, Nalls MA, Peuralinna T, Jansson L, Isoviita VM, Kaivorinne AL, Hölttä-Vuori M, Ikonen E, Sulkava R, Benatar M, Wu J, Chiò A, Restagno G, Borghero G, Sabatelli M, ITALSGEN Consortium, Heckerman D, Rogava E, Zinman L, Rothstein JD,

- Sendtner M, Drepper C, Eichler EE, Alkan C, Abdullaev Z, Pack SD, Dutra A, Pak E, Hardy J, Singleton A, Williams NM, Heutink P, Pickering-Brown S, Morris HR, Tienari PJ & Traynor BJ, A hexanucleotide repeat expansion in *C9ORF72* is the cause of chromosome 9p21 - linked ALS-FTD, *Neuron*, 2011, 72(2): 257-268.
- Reynolds GP, Arnold L, Rossor MN, Iversen LL, Mountjoy CQ & Roth M, Reduced binding of [3H]ketanserin to cortical 5-HT₂ receptors in senile dementia of the Alzheimer type, *Neuroscience letters*, 1984, 44(1): 47-51.
- Risch NJ, Searching for genetic determinants in the new millennium, *Nature*, 2000, 405(6788): 847-856.
- Rizzu P, van Mil SE, Anar B, Rosso SM, Donker Kaat L, Heutink P & Van Swieten JC, *CHMP2B* mutations are not a cause of dementia in Dutch patients with familial and sporadic frontotemporal dementia, *American journal of medical genetics, Part B: Neuropsychiatric genetics*, 2006, 141B(8): 944-946.
- Robinson DS, Sourkes TL, Nies A, Harris LS, Spector S, Bartlett DL & Kaye IS, Monoamine metabolism in human brain, *Archives of general psychiatry*, 1977, 34(1): 89-92.
- Rocchi A, Micheli D, Ceravolo R, Manca ML, Tognoni G, Siciliano G & Murri L, Serotonergic polymorphisms (5-HTTLPR and 5-HT_{2A}): association studies with psychosis in Alzheimer disease, *Genetic Testing*, 2003, 7(4): 309-314.
- Roeber S, Mackenzie IR, Kretzschmar HA & Neumann M, TDP-43 - negative FTLD-U is a significant new clinico-pathological subtype of FTLD, *Acta neuropathologica*, 2008, 116(2): 147-157.
- Rohrer JD, Guerreiro R, Vandrovцова J, Uphill J, Reiman D, Beck J, Isaacs AM, Authier A, Ferrari R, Fox NC, Mackenzie IR, Warren JD, de Silva R, Holton J, Revesz T, Hardy J, Mead S & Rossor MN, The heritability and genetics of frontotemporal lobar degeneration, *Neurology*, 2009, 73(18): 1451-1456.
- Rohrer JD, Lashley T, Schott JM, Warren JE, Mead S, Isaacs AM, Beck J, Hardy J, de Silva R, Warrington E, Troakes C, Al-Sarraj S, King A, Borroni B, Clarkson MJ, Ourselin S, Holton JL, Fox NC, Revesz T, Rossor MN & Warren JD, Clinical and neuroanatomical signatures of tissue pathology in frontotemporal lobar degeneration, *Brain*, 2011, 134(Pt 9): 2565-2581.
- Rohrer JD, Structural brain imaging in frontotemporal dementia, *Biochimica et biophysica acta*, 2012, 1822(3): 325-332.
- Rolf N, Knoefler R, Suttrop M, Klüter H & Bugert P, Optimized procedure for platelet RNA profiling from blood samples with limited platelet numbers, *Clinical chemistry*, 2005, 51(6): 1078-1080.
- Ronald J, Akey JM, Whittle J, Smith EN, Yvert G & Kruglyak L, Simultaneous genotyping, gene - expression measurement, and detection of allele - specific expression with oligonucleotide arrays, *Genome research*, 2005, 15(2): 284-291.
- Rosenblum BB, Lee LG, Spurgeon SL, Khan SH, Menchen SM, Heiner CR & Chen SM, New dye - labeled terminators for improved DNA sequencing patterns, *Nucleic acids research*, 1997, 25(22): 4500-4504.
- Rosso SM, Donker Kaat L, Baks T, Joosse M, de Koning I, Pijnenburg Y, de Jong D, Dooijes D, Kamphorst W, Ravid R, Niermeijer MF, Verheij F, Kremer HP, Scheltens P, van Duijn CM, Heutink P & van Swieten JC, Frontotemporal dementia in The Netherlands: patient characteristics and prevalence estimates from a population - based study, *Brain*, 2003, 126(Pt 9): 2016-2022.
- Rosso SM, Kamphorst W, de Graaf B, Willemsen R, Ravid R, Niermeijer MF, Spillantini MG, Heutink P & van Swieten JC, Familial frontotemporal dementia with ubiquitin - positive inclusions is linked to chromosome 17q21 - 22, *Brain*, 2001, 124(Pt 10): 1948-1957.
- Rossor MN, Fox NC, Mummery CJ, Schott JM & Warren JD, The diagnosis of young - onset dementia, *Lancet neurology*, 2010, 9(8): 793-806.

- Roth BL, Nakaki T, Chuang DM & Costa E, Aortic recognition sites for serotonin (5HT) are coupled to phospholipase C and modulate phosphatidylinositol turnover, *Neuropharmacology*, 1984, 23(10): 1223-1225.
- Roth GJ, Hickey MJ, Chung DW & Hickstein DD, Circulating human blood platelets retain appreciable amounts of poly (A)+ RNA, *Biochemical and biophysical research communications*, 1989, 160(2): 705-710.
- Rovelet-Lecrux A, Deramecourt V, Legallic S, Maurage CA, Le Ber I, Brice A, Lambert JC, Frébourg T, Hannequin D, Pasquier F & Campion D, Deletion of the *progranulin* gene in patients with frontotemporal lobar degeneration or Parkinson disease, *Neurobiology of disease*, 2008, 31(1): 41-45.
- Rozen S & Skaletsky H, Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, *in*: Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology, Misener S & Krawetz SA, Humana Press, Totowa, NJ, 2000, Vol. 132, pp 365-386.
- Rubino E, Rainero I, Chiò A, Rogaeva E, Galimberti D, Fenoglio P, Grinberg Y, Isaia G, Calvo A, Gentile S, Bruni AC, St George-Hyslop PH, Scarpini E, Gallone S, Pinessi L & TODEM Study Group, SQSTM1 mutations in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis, *Neurology*, 2012, 79(15): 1556-1562.
- Rubinow DR, Schmidt PJ & Roca CA, Estrogen - serotonin interactions: implications for affective regulation, *Biological psychiatry*, 1998, 44(9): 839-850.
- Rutherford NJ, Zhang YJ, Baker M, Gass JM, Finch NA, Xu YF, Stewart H, Kelley BJ, Kuntz K, Crook RJ, Sreedharan J, Vance C, Sorenson E, Lippa C, Bigio EH, Geschwind DH, Knopman DS, Mitsumoto H, Petersen RC, Cashman NR, Hutton M, Shaw CE, Boylan KB, Boeve B, Graff-Radford NR, Wszolek ZK, Caselli RJ, Dickson DW, Mackenzie IR, Petrucelli L & Rademakers R, Novel mutations in TARDBP (TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis, *PLoS genetics*, 2008, 4(9): e1000193.
- Rybackyk LA, Bashaw MJ, Pathak DR, Moody SM, Gilders RM & Holzschu DL, An overlooked connection: serotonergic mediation of estrogen - related physiology and pathology, *BCM women's health*, 2005, 5: 12.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA & Arnheim N, Enzymatic amplification of beta - globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, 1985, 230(4732): 1350-1354.
- Saiz PA, García-Portilla MP, Paredes B, Arango C, Morales B, Alvarez V, Coto E, Bascaran MT, Bousoño M & Bobes J, Association between the A-1438G polymorphism of the serotonin 2A receptor gene and nonimpulsive suicide attempts, *Psychiatric genetics*, 2008, 18(5): 213-218.
- Salmon E, A review of the literature on neuroimaging of serotonergic function in Alzheimer's disease and related disorders, *Journal of neural transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 2007, 114(9): 1179-1185.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T, Isolation of High - Molecular - Weight DNA from Mammalian Cells, *in*: Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Second edition, Irwin N, Ford N, Ferguson M & Ockler M, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1987, Cap 9: pp 9.14-9.22.
- Sanders-Bush E, Fentress H & Hazelwood L, Serotonin 5-HT₂ receptors: molecular and genomic diversity, *Molecular interventions*, 2003, 3(6): 319-330.
- Sanger F, Nicklen S & Coulson AR, DNA sequencing with chain - terminating inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977, 74(12): 5463-5467.
- Santana I & Cunha L, Demência(s) manual para médicos, Faculdade de Medicina - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2005, pp 7-9.

- Schedel A & Rolf N, Genome - wide platelet RNA profiling in clinical samples, *Methods in molecular biology*, 2009, 496: 273-283.
- Schlachetzki J, Frontotemporal lobar degeneration, *in: Advanced Understanding of Neurodegenerative Diseases*, Chang RC, In tech, Rijeka, Croatia, 2011, Cap 10: pp213-237.
- Schröder R, Watts GD, Mehta SG, Evert BO, Broich P, Fliessbach K, Pauls K, Hans VH, Kimonis V & Thal DR, Mutant valosin - containing protein causes a novel type of frontotemporal dementia, *Annals of neurology*, 2005, 57(3): 457-461.
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M & Ragg T, The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements, *BMC molecular biology*, 2006, 7: 3.
- Schwarz MJ, Chiang S, Müller N & Ackenheil M, T-helper-1 and T-helper-2 responses in psychiatric disorders, *Brain, behavior, and immunity*, 2001a, 15(4): 340-370.
- Schwarz MJ, Müller N., Riedel M & Ackenheil M, The Th2 - hypothesis of schizophrenia: strategy to identify a subgroup of schizophrenia caused by immune mechanisms, *Medical hypotheses*, 2001b, 56(4): 483-486.
- See TM, LaMarre AK, Lee SE & Miller BL, Genetic causes of frontotemporal degeneration, *Journal of geriatric psychiatry and neurology*, 2010, 23(4): 260-268.
- Seelaar H, Kamphorst W, Rosso SM, Azmani A, Masdjedi R, de Koning I, Maat-Kievit JA, Anar B, Donker Kaat L, Breedveld GJ, Dooijes D, Rozemuller JM, Bronner IF, Rizzu P & van Swieten JC, Distinct genetic forms of frontotemporal dementia, *Neurology*, 2008, 71(16): 1220-1226.
- Seelaar H, Klijnsma KY, de Koning I, van der Lugt A, Chiu WZ, Azmani A, Rozemuller AJ & van Swieten JC, Frequency of ubiquitin and FUS - positive, TDP-43 - negative frontotemporal lobar degeneration, *Journal of neurology*, 2010, 257(5): 747-753.
- Seelaar H, Rohrer JD, Pijnenburg YA, Fox NC & van Swieten JC, Clinical, genetic and pathological heterogeneity of frontotemporal dementia: a review, *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 2011, 82(5): 476-486.
- Seltman RE & Matthews BR, Frontotemporal lobar degeneration: epidemiology, pathology, diagnosis and management, *CNS drugs*, 2012, 26(10): 841-870.
- Serebruany VL, El Mouelhi M, Pfannkuche HJ, Rose K, Marro M & Angiolillo DJ, Investigations on 5-HT₄ Receptor expression and effects of tegaserod on human platelet aggregation in vitro, *American journal of therapeutics*, 2010, 17(6): 543-552.
- Sharman JL, Benson HE, Pawson AJ, Lukito V, Mpamhanga CP, Bombail V, Davenport AP, Peters JA, Spedding M, Harmar AJ & NC-IUPHAR, IUPHAR-DB: updated database content and new features, *Nucleic acids research*, 2013, 41(Database issue): D1083-D1088.
- Shashkin PN, Brown GT, Ghost A, Marathe GK & McIntyre TM, Lipopolysaccharide is a Direct Agonist for Platelet RNA Splicing, *The journal of immunology*, 2008, 181(5): 3495-3502.
- Shatunov A, Mok K, Newhouse S, Weale ME, Smith B, Vance C, Johnson L, Veldink JH, van Es MA, van den Berg LH, Robberecht W, Van Damme P, Hardiman O, Farmer AE, Lewis CM, Butler AW, Abel O, Andersen PM, Fogh I, Silani V, Chiò A, Traynor BJ, Melki J, Meininger V, Landers JE, McGuffin P, Glass JD, Pall H, Leigh PN, Hardy J, Brown RH Jr, Powell JF, Orrell RW, Morrison KE, Shaw PJ, Shaw CE & Al-Chalabi A, Chromosome 9p21 in sporadic amyotrophic lateral sclerosis in the UK and seven other countries: a genome - wide association study, *Lancet neurology*, 2010, 9(10): 986-994.
- Shendure JA, Porreca GJ, Church GM, Gardner AF, Hendrickson CL, Kieleczawa J & Slatko BE, Overview of DNA Sequencing Strategies, *Current Protocols in Molecular Biology*, 2008, Cap 7: Unit 7.1.
- Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM & Sirotkin K, dbSNP: the NCBI database of genetic variation, *Nucleic acids research*, 2001, 29(1): 308-311.

- Shi J, Shaw CL, Du Plessis D, Richardson AM, Bailey KL, Julien C, Stopford C, Thompson J, Varma A, Craufurd D, Tian J, Pickering-Brown S, Neary D, Snowden JS & Mann DM, Histopathological changes underlying frontotemporal lobar degeneration with clinicopathological correlation, *Acta neuropathologica*, 2005, 110(5): 501-512.
- Shumaker JM, Metspalu A & Caskey CT, Mutation detection by solid phase primer extension, *Human mutation*, 1996, 7(4): 346-354.
- Singh AN, Barlas C, Saeedi H & Mishra RK, Effect of loxapine on peripheral dopamine-like and serotonin receptors in patients with schizophrenia, *Journal of psychiatry & neuroscience*, 2003, 28(1): 39-47.
- Sjögren M, Minthon L, Passant U, Blennow K & Wallin A, Decreased monoamine metabolites in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease, *Neurobiology of aging*, 1998, 19(5): 379-384.
- Sjögren M & Wallin A, Pathophysiological aspects of frontotemporal dementia - emphasis on cytoskeleton proteins and autoimmunity, *Mechanisms of ageing and development*, 2001, 122(16): 1923-1935.
- Sjögren M, Folkesson S, Blennow K & Tarkowski E, Increased intrathecal inflammatory activity in frontotemporal dementia: pathophysiological implications, *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 2004, 75(8): 1107-1111.
- Skibinski G, Parkinson NJ, Brown JM, Chakrabarti L, Lloyd SL, Hummerich H, Nielsen JE, Hodges JR, Spillantini MG, Thusgaard T, Brandner S, Brun A, Rossor MN, Gade A, Johannsen P, Sørensen SA, Gydesen S, Fisher EM & Collinge J, Mutations in the endosomal ESCRTIII - complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia, *Nature genetics*, 2005, 37(8): 806-808.
- Slegers K, Cruts M & Van Broeckhoven C, Molecular pathways of frontotemporal lobar degeneration, *Annual review of neuroscience*, 2010, 33: 71-88.
- Smith LM, Fung S, Hunkapiller MW, Hunkapiller TJ & Hood LE, The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus: synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis, *Nucleic acids research*, 1985, 13(7): 2399-2412.
- Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SB & Hood LE, Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis, *Nature*, 1986, 321(6071): 674-679.
- Snowden J, Neary D & Mann D, Frontotemporal lobar degeneration: clinical and pathological relationships, *Acta neuropathologica*, 2007, 114(1): 31-38.
- Snowden JS, Neary D & Mann DM, Autopsy proven sporadic frontotemporal dementia due to microvacuolar - type histology, with onset at 21 years of age, *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 2004, 75(9): 1337-1339.
- Snowden JS, Neary D & Mann DM, Frontotemporal dementia, *The British journal of psychiatry*, 2002, 180: 140-143.
- Sokolov BP, Primer extension technique for the detection of single nucleotides in genomic DNA, *Nucleic acids research*, 1990, 18(12): 3671.
- Sonier B, Lavigne C, Arseneault M, Ouellette R & Vaillancourt C, Expression of the 5-HT_{2A} serotonergic receptor in human placenta and choriocarcinoma cells: mitogenic implications of serotonin, *Placenta*, 2005, 26(6): 484-490.
- Sottile J, Mosher DF, Fullenweider J & George JN, Human platelets contain mRNA transcripts for platelet factor 4 and actin, *Thrombosis and haemostasis*, 1989, 62(4): 1100-1102.
- Sparkes RS, Lan N, Klisak I, Mohandas T, Diep A, Kojis T, Heinzmann C & Shih JC, Assignment of a serotonin 5HT-2 receptor gene (*HTR2*) to human chromosome 13q14-q21 and mouse chromosome 14, *Genomics*, 1991, 9(3): 461-465.

- Sparks DL & Markesbery WR, Altered serotonergic and cholinergic synaptic markers in Pick's disease, *Archives of neurology*, 1991, 48(8): 796-799.
- Spillantini MG, Goedert M, Crowther RA, Murrell JR, Farlow MR & Ghetti B, Familial multiple system tauopathy with presenile dementia: a disease with abundant neuronal and glial tau filaments, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(8): 4113-4118.
- Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A & Ghetti B, Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(13): 7737-7741.
- Spurlock G, Heils A, Holmans P, Williams J, D'Souza UM, Cardno A, Murphy KC, Jones L, Buckland PR, McGuffin P, Lesch KP & Owen MJ, A family based association study of T102C polymorphism in 5HT2A and schizophrenia plus identification of new polymorphisms in the promoter, *Molecular psychiatry*, 1998, 3(1): 42-49.
- Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E, Baralle F, de Bellerocche J, Mitchell JD, Leigh PN, Al-Chalabi A, Miller CC, Nicholson G & Shaw CE, TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis, *Science*, 2008, 319(5870): 1668-1672.
- Stahl SM, Peripheral models for the study of neurotransmitter receptors in man, *Psychopharmacology bulletin*, 1985, 21(3): 663-671.
- Stephan B & Brayne C, Prevalence and projections of dementia, *in: Excellence in dementia care, Research into practice*, Downs M & Bowers B, The McGraw-Hills Companies, Inc., NY, USA, 2008, Cap1: 9-34.
- Sternbach H, Age - associated testosterone decline in men: clinical issues for psychiatry, *The American journal of psychiatry*, 1998, 155(10): 1310-1318.
- Sternberg EM, Neural - immune interactions in health and disease, *The journal of clinical investigation*, 1997, 100(11): 2641-2647.
- Stirling D, Quality Control in PCR, *in: PCR Protocols, Methods in Molecular Biology™*, Second Edition, Bartlett JMS & Stirling D, Humana Press, Totowa, NJ, 2003a, Vol. 226, Cap 4: pp 21-23.
- Stirling D, Sequencing, *in: PCR Protocols, Methods in Molecular Biology™*, Second Edition, Bartlett JMS & Stirling D, Humana Press, Totowa, NJ, 2003b, Vol. 226, Cap 49: pp 337-340.
- Stranger BE, Nica AC, Forrest MS, Dimas A, Bird CP, Beazley C, Ingle CE, Dunning M, Flicek P, Koller D, Montgomery S, Tavaré S, Deloukas P & Dermitzakis ET, Population genomics of human gene expression, *Nature genetics*, 2007, 39(10): 1217-1224.
- Sugden K, Tichopad A, Khan N, Craig IW & D'Souza UM, Genes within the serotonergic system are differentially expressed in human brain, *BMC neuroscience*, 2009, 10: 50.
- Suzuki K, Kusumi I, Sasaki Y & Koyama T, Serotonin - induced platelet intracellular calcium mobilization in various psychiatric disorders: is it specific to bipolar disorder?, *Journal of affective disorders*, 2001, 64(2-3): 291-296.
- Suzuki T, Higgins PJ & Crawford DR, Control selection for RNA quantitation, *BioTechniques*, 2000, 29(2): 332-337.
- Swartz JR, Miller BL, Lesser IM & Darby AL, Frontotemporal dementia: treatment response to serotonin selective reuptake inhibitors, *The Journal of clinical psychiatry*, 1997, 58(2): 212-216.
- Swerdloff RS & Wang C, Androgen deficiency and aging in men, *Western journal of medicine*, 1993, 159(5): 579-585.
- Syvänen AC, Aalto-Setälä K, Harju L, Kontula K & Söderlund H, A primer - guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein E, *Genomics*, 1990, 8(4): 684-692.

- Syvänen AC, From gels to chips: "Minisequencing" primer extension for analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms, *Human Mutation*, 1999, 13(1): 1-10.
- Tarkowski E, Blennow K, Wallin A & Tarkowski A, Intracerebral production of tumor necrosis factor - alpha, a local neuroprotective agent, in Alzheimer disease and vascular dementia, *Journal of clinical immunology*, 1999, 19(4): 223-230.
- Tartaglia MC, Sidhu M, Laluz V, Racine C, Rabinovici GD, Creighton K, Karydas A, Rademakers R, Huang EJ, Miller BL, DeArmond SJ & Seeley WW, Sporadic corticobasal syndrome due to FTLTDP, *Acta neuropathologica*, 2010, 119(3): 365-374.
- Taylor CF & Taylor GR, Current and emerging techniques for diagnostic mutation detection, An overview of methods for mutation detection, *in: Molecular Diagnosis of Genetic Diseases, Methods in molecular medicine*, Second edition, Elles R & Mountford R, Humana Press, Totowa, NJ, 2004, Vol. 92, Cap 2: pp 9-31.
- Teare JM, Islam R, Flanagan R, Gallagher S, Davies MG & Grabau C, Measurement of nucleic acid concentrations using the DyNA Quant and the GeneQuant, *BioTechniques*, 1997, 22(6): 1170-1174.
- Temin HM & Muzatani S, RNA - dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus, *Nature*, 1970, 266(5252): 1211-1213.
- Terry AV Jr, Buccafusco JJ & Wilson C, Cognitive dysfunction in neuropsychiatric disorders: selected serotonin receptor subtypes as therapeutic targets, *Behavioral brain research*, 2008, 195(1): 30-38.
- The Lund and Manchester groups, Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia, *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 1994, 57(4): 416-418.
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A & Heinen E, Housekeeping genes as internal standards: use and limits, *Journal of Biotechnology*, 1999, 75(2-3): 291-295.
- Thermo Scientific, NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual, Thermo Fisher Scientific Incorporated Inc, Wilmington, DE, USA, 2008, pp 1-1 - 5-3.
- Thermo Scientific, Thermo Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR, Thermo Fisher Scientific Inc., Vilnius, Lithuania, 2012, pp 2-5.
- Trojanowski JQ & Dickson D, Update on the neuropathological diagnosis of frontotemporal dementias, *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 2001, 60(12): 1123-1126.
- Ts'ao CH, Rough endoplasmic reticulum and ribosomes in blood platelets, *Scandinavian journal of haematology*, 1971, 8(2): 134-140.
- Tully G, Sullivan KM, Nixon P, Stones RE & Gill P, Rapid detection of mitochondrial sequence polymorphisms using multiplex solid - phase fluorescent minisequencing, *Genomics*, 1996, 34(1): 107-113.
- Turnbull AV & Rivier CL, Regulation of the hypothalamo - pituitary - adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action, *Physiological reviews*, 1999, 79(1): 1-71.
- Twarog BM & Page IH, Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination, *The American journal of physiology*, 1953, 175(1): 157-161.
- Urwin H, Josephs KA, Rohrer JD, Mackenzie IR, Neumann M, Authier A, Seelaar H, Van Swieten JC, Brown JM, Johannsen P, Nielsen JE, Holm IE, The FReJA Consortium, Dickson DW, Rademakers R, Graff-Radford NR, Parisi JE, Petersen RC, Hatanpaa KJ, White CL 3rd, Weiner MF, Geser F, Van Deerlin VM, Trojanowski JQ, Miller BL, Seeley WW, van der Zee J, Kumar-Singh S, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Bigio EH, Deng HX, Halliday GM, Kril JJ, Munoz DG, Mann DM, Pickering-Brown SM, Doodeman V, Adamson G, Ghazi-Noori S, Fisher EM, Holton JL, Revesz T, Rossor MN, Collinge J, Mead S & Isaacs AM, FUS pathology defines the

- majority of tau - and TDP-43 - negative frontotemporal lobar degeneration, *Acta neuropathologica*, 2010, 120(1): 33-41.
- Valasek MA & Repa JJ, The power of real-time PCR, *Advances in physiology education*, 2005, 29(3): 151-159.
- Valdmanis PN, Dupre N, Bouchard JP, Camu W, Salachas F, Meininger V, Strong M & Rouleau GA, Three families with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia with evidence of linkage to chromosome 9p, *Archives of neurology*, 2007, 64(2): 240-245.
- Van Deerlin VM, Leverenz JB, Bekris LM, Bird TD, Yuan W, Elman LB, Clay D, Wood EM, Chen-Plotkin AS, Martinez-Lage M, Steinbart E, McCluskey L, Grossman M, Neumann M, Wu IL, Yang WS, Kalb R, Galasko DR, Montine TJ, Trojanowski JQ, Lee VM, Schellenberg GD & Yu CE, TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis, *Lancet neurology*, 2008, 7(5): 409-416.
- van der Flier WM & Scheltens P, Epidemiology and risk factors of dementia, *Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry*, 2005, 76(Suppl V5): v2-v7.
- van der Zee J, Rademakers R, Engelborghs S, Gijselinck I, Bogaerts V, Vandenberghe R, Santens P, Caekebeke J, De Pooter T, Peeters K, Lübke U, Van den Broeck M, Martin JJ, Cruts M, De Deyn PP, Van Broeckhoven C & Dermaut B, A Belgian ancestral haplotype harbours a highly prevalent mutation for 17q21 - linked tau - negative FTLD, *Brain*, 2006, 129(Pt 4): 841-852.
- van der Zee J, Urwin H, Engelborghs S, Bruyland M, Vandenberghe R, Dermaut B, De Pooter T, Peeters K, Santens P, De Deyn PP, Fisher EM, Collinge J, Isaacs AM & Van Broeckhoven C, *CHMP2B* C-truncating mutations in frontotemporal lobar degeneration are associated with an aberrant endosomal phenotype *in vitro*, *Human molecular genetics*, 2008, 17(2): 313-322.
- van Es MA, Veldink JH, Saris CG, Blauw HM, van Vught PW, Birve A, Lemmens R, Schelhaas HJ, Groen EJ, Huisman MH, van der Kooij AJ, de Visser M, Dahlberg C, Estrada K, Rivadeneira F, Hofman A, Zwarts MJ, van Doormaal PT, Rujescu D, Strengman E, Giegling I, Muglia P, Tomik B, Slowik A, Uitterlinden AG, Hendrich C, Waibel S, Meyer T, Ludolph AC, Glass JD, Purcell S, Cichon S, Nöthen MM, Wichmann HE, Schreiber S, Vermeulen SH, Kiemeneij LA, Wokke JH, Cronin S, McLaughlin RL, Hardiman O, Fumoto K, Pasterkamp RJ, Meininger V, Melki J, Leigh PN, Shaw CE, Landers JE, Al-Chalabi A, Brown RH Jr, Robberecht W, Andersen PM, Ophoff RA & van den Berg LH, Genome - wide association study identifies 19p13.3 (UNC13A) and 9p21.2 as susceptibility loci for sporadic amyotrophic lateral sclerosis, *Nature genetics*, 2009, 41(10): 1083-1087.
- Van Langenhove T, van der Zee J, Sleegers K, Engelborghs S, Vandenberghe R, Gijselinck I, Van den Broeck M, Mattheijssens M, Peeters K, De Deyn PP, Cruts M & Van Broeckhoven C, Genetic contribution of *FUS* to frontotemporal lobar degeneration, *Neurology*, 2010, 74(5): 366-371.
- Vance C, Al-Chalabi A, Ruddy D, Smith BN, Hu X, Sreedharan J, Siddique T, Schelhaas HJ, Kusters B, Troost D, Baas F, de Jong V & Shaw CE, Familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia is linked to a locus on chromosome 9p13.2 - 21.3, *Brain*, 2006, 129(Pt 4): 868-876.
- Vance C, Rogelj B, Hortobágyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, Hu X, Smith B, Ruddy D, Wright P, Ganesalingam J, Williams KL, Tripathi V, Al-Saraj S, Al-Chalabi A, Leigh PN, Blair IP, Nicholson G, de Belleruche J, Gallo JM, Miller CC & Shaw CE, Mutations in *FUS*, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6, *Science*, 2009, 323(5918): 1208-1211.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A & Speleman F, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome biology*, 2002, 3(7): RESEARCH0034.

- Venturelli E, Villa C, Fenoglio C, Clerici F, Marcone A, Ghidoni R, Cortini F, Scalabrini D, Gallone S, Rainero I, Mandelli A, Restelli I, Binetti G, Cappa S, Mariani C, Giordana MT, Bresolin N, Scarpini E & Galimberti D, The *NOS3 G894T* (Glu298Asp) polymorphism is a risk factor for frontotemporal lobar degeneration, *European journal of neurology*, 2009, 16(1): 37-42.
- Venturelli E, Villa C, Scarpini E, Fenoglio C, Guidi I, Lovati C, Marcone A, Cortini F, Scalabrini D, Clerici F, Bresolin N, Mariani C, Cappa S & Galimberti D, Neuronal nitric oxide synthase C276T polymorphism increases the risk for frontotemporal lobar degeneration, *European journal of neurology*, 2008, 15(1): 77-81.
- Viljoen GJ, Nel LH & Crowther JR, Molecular Diagnostics PCR Handbook, IAEA, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2005, pp 3-73.
- Villa C, Ghezzi L, Fenoglio C, Clerici F, Marcone A, Benussi L, Ghidoni R, Gallone S, Serpente M, Cantoni C, Ridolfi E, Bonsi R, Cerami C, Cappa S, Binetti G, Franceschi M, Rainero I, Mariani C, Bresolin N, Scarpini E & Galimberti D, Genetics and Expression Analysis of the Specificity Protein 4 Gene (SP4) in Patients with Alzheimer's Disease and Frontotemporal Lobar Degeneration, *Journal of Alzheimer's disease*, 2012, 31(3): 537-542.
- von Strauss E, Viitanen M, De Ronchi D, Winblad B & Fratiglioni L, Aging and the occurrence of dementia: findings from a population - based cohort with a large sample of nonagenarians, *Archives of neurology*, 1999, 56(5): 587-592.
- Vroling B, Sanders M, Baakman C, Borrmann A, Verhoeven S, Klomp J, Oliveira L, de Vlieg J & Vriend G, GPCRDB: information system for G protein - coupled receptors, *Nucleic acids research*, 2011, 39(Database issue): D309-D319.
- Waldman YY, Tuller T, Keinan A & Ruppin E, Selection for translation efficiency on synonymous polymorphisms in recent human evolution, *Genome biology and evolution*, 2011, 3: 749-761.
- Wallace AJ, Mutation scanning for the clinical laboratory, Automated fluorescent sequencing, in: Molecular Diagnosis of Genetic Diseases, Methods in molecular medicine, Second edition, Elles R & Mountfor R, Humana Press, Totowa, NJ, 2004, Vol. 92, Cap 5: pp 81-114.
- Wancata J, Musalek M, Alexandrowicz R & Krautgartner M, Number of dementia sufferers in Europe between the years 2000 and 2050, *European psychiatry*, 2003, 18(6): 306-313.
- Wang G, Hu C, Jiang T, Luo J, Hu J, Ling S, Liu M & Xing G, Overexpression of serotonin receptor and transporter mRNA in blood leucocytes of antipsychotic - free and antipsychotic - naïve schizophrenic patients: gender differences, *Schizophrenia research*, 2010, 121(1-3): 160-171.
- Wang HY, Wang IF, Bose J & Shen CK, Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family, *Genomics*, 2004b, 83(1): 130-139.
- Wang L, Östberg O, Wihlborg AK, Brogren H, Jern S & Erlinge D, Quantification of ADP and ATP receptor expression in human platelets, *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 2003, 1(2): 330-336.
- Wang Q, Song C & Li CC, Molecular perspectives on p97 - VCP: progress in understanding its structure and diverse biological functions, *Journal of structural biology*, 2004a, 146(1-2): 44-57.
- Watts GD, Thomasova D, Ramdeen SK, Fulchiero EC, Mehta SG, Drachman DA, Weihl CC, Jamrozik Z, Kwiecinski H, Kaminska A & Kimonis VE, Novel VCP mutations in inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia, *Clinical genetics*, 2007, 72(5): 420-426.
- Watts GD, Wymer J, Kovach MJ, Mehta SG, Mumm S, Darvish D, Pestronk A, Whyte MP & Kimonis VE, Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin - containing protein, *Nature genetics*, 2004, 36(4): 377-381.

- Weder ND, Aziz R, Wilkins K & Tampi RR, Frontotemporal dementias: a review, *Annals of general psychiatry*, 2007, 6: 15.
- Weihl CC, Dalal S, Pestronk A & Hanson PI, Inclusion body myopathy - associated mutations in p97/VCP impair endoplasmic reticulum - associated degradation, *Human molecular genetics*, 2006, 15(2): 189-199.
- Weinberg W (1908), On the demonstration of heredity in man, *in: Papers on human genetics*, Boyer SH, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1963, pp 4-15.
- Werle E, Schneider C, Renner M, Völker M & Fiehn W, Convenient single - step, one tube purification of PCR products for direct sequencing, *Nucleic acids research*, 1994, 22(20): 4354-4355.
- Wightman G, Anderson VE, Martin J, Swash M, Anderton BH, Neary D, Mann D, Luthert P & Leigh PN, Hippocampal and neocortical ubiquitin - immunoreactive inclusions in amyotrophic lateral sclerosis with dementia, *Neuroscience letters*, 1992, 139(2): 269-274.
- Wilhelmsen KC, Lynch T, Pavlou E, Higgins M & Nygaard TG, Localization of disinhibition - dementia - parkinsonism - amyotrophy complex to 17q21 - 22, *American journal of human genetics*, 1994, 55(6): 1159-1165.
- Williams J, Spurlock G, McGuffin P, Mallet J, Nöthen MM, Gill M, Aschauer H, Nylander PO, Macciardi F & Owen MJ, Association between schizophrenia and T102C polymorphism of the 5-hydroxytryptamine type 2a-receptor gene, *Lancet*, 1996, 347(9011): 1294-1296.
- Williams RB, Marchuk DA, Gadde KM, Barefoot JC, Grichnik K, Helms MJ, Kuhn CM, Lewis JG, Schanberg SM, Stafford-Smith M, Suarez EC, Clary GL, Svenson IK & Siegler IC, Serotonin - related gene polymorphisms and central nervous system serotonin function, *Neuropsychopharmacology*, 2003, 28(3): 533-541.
- Wimo A, Jönsson L, Bond J, Prince M, Winblad B & Alzheimer Disease International, The worldwide economic impact of dementia 2010, *Alzheimer's & dementia*, 2013, 9(1): 1-11.
- Wittkopp PJ, Haerum BK & Clark AG, Evolutionary changes in *cis* and *trans* gene regulation, *Nature*, 2004, 430(6995): 85-88.
- World Health Organization, The ICD-10-Classification of Mental and Behavioural Disorders, Clinical descriptions and diagnostic guidelines, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1992, pp 45.
- Woulfe J, Kertesz A & Munoz DG, Frontotemporal dementia with ubiquitinated cytoplasmic and intranuclear inclusions, *Acta neuropathologica*, 2001, 102(1): 94-102.
- Yamaoka LH, Welsh-Bohmer KA, Hulette CM, Gaskell PC Jr, Murray M, Rimmler JL, Helms BR, Guerra M, Roses AD, Schmechel DE & Pericak-Vance MA, Linkage of frontotemporal dementia to chromosome 17: clinical and neuropathological characterization of phenotype, *American journal of human genetics*, 1996, 59(6): 1306-1312.
- Yan H, Snapshot of the allele - specific variation in human gene expression, *Methods in molecular biology*, 2005, 311: 31-38.
- Yan J, Deng HX, Siddique N, Fecto F, Chen W, Yang Y, Liu E, Donkervoort S, Zheng JG, Shi Y, Ahmeti KB, Brooks B, Engel WK & Siddique T, Frameshift and novel mutations in *FUS* in familial amyotrophic lateral sclerosis and ALS/dementia, *Neurology*, 2010, 75(9): 807-814.
- Yang CH, Cheng YH, Yang CH & Chuang LY, Mutagenic primer design for PCR-RFLP SNP genotyping using a genetic algorithm, *IEEE/ACM transactions on computational biology and bioinformatics*, 2012, 9(3): 837-845.
- Yang GB, Qiu CL, Zhao H, Liu Q & Shao Y, Expression of mRNA for multiple serotonin (5-HT) receptor types/subtypes by the peripheral blood mononuclear cells of rhesus macaques, *Journal of neuroimmunology*, 2006, 178(1-2): 24-29.

- Yang L, Embree LJ, Tsai S & Hickstein DD, Oncoprotein TLS interacts with serine - arginine proteins involved in RNA splicing, *The Journal of biological chemistry*, 1998, 273(43): 27761-27764.
- Yang Q, Khoury MJ, Friedman J, Little J & Flanders WD, How many genes underlie the occurrence of common complex diseases in the population?, *International journal of epidemiology*, 2005, 34(5): 1129-1137.
- Yang Y & Schmitt HP, Frontotemporal dementia: evidence for impairment of ascending serotonergic but not noradrenergic innervation. Immunocytochemical and quantitative study using a graph method, *Acta neuropathologica*, 2001, 101(3): 256-270.
- Zhang K, Li JB, Gao Y, Egli D, Xie B, Deng J, Li Z, Lee JH, Aach J, Leproust EM, Eggan K & Church GM, Digital RNA allelotyping reveals tissue - specific and allele - specific gene expression in human, *Nature methods*, 2009, 6(8): 613-618.
- Ziebarth JD, Bhattacharya Am Chen A & Cui Y, PolymiRTS Database 2.0: linking polymorphisms in microRNA target sites with human diseases and complex traits, *Nucleic acids research*, 2012, 40(D1): D216-D221.
- Zinszner H, Sok J, Immanuel D, Yin Y & Ron D, TLD (FUS) binds RNA in vivo and engages in nucleo - cytoplasmic shuttling, *Journal of Cell Science*, 1997, 110(Pt 15): 1741-1750.
- Zsóri KS, Muszbek L, Csiki Z & Shemirani AH, Validation of reference genes for the determination of platelet transcript level in healthy individuals and in patients with the history of myocardial infarction, *International journal of molecular sciences*, 2013, 14(2): 3456-3466.