



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO
INTEGRADO EM MEDICINA**

JOSÉ GUILHERME NERI MIRANDA PIRES

***CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE DOENTES E
PORTADORES DA EXPANSÃO
HEXANUCLEOTÍDICA NO GENE C9ORF72***

ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL

ÁREA CIENTÍFICA DE NEUROLOGIA

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:
DOUTORA MARIA DO ROSÁRIO ALMEIDA
PROFESSORA DOUTORA MARIA ISABEL JACINTO SANTANA**

MARÇO/2014

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra



Trabalho Final do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina

Características clínicas de doentes e portadores da expansão hexanucleotídica no gene *C9ORF72*

Artigo Científico

Autor: José Guilherme Neri Miranda Pires

Orientador: Doutora Maria do Rosário Almeida¹

Co-orientador: Professora Doutora Maria Isabel Jacinto Santana²

Correspondência:

José Guilherme Neri Miranda Pires

Quinta da Romeira, lote 10, 3º esquerdo

3030-782 Coimbra, Portugal

jguilhermenmpires@gmail.com

¹ Investigadora Auxiliar, Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra, Portugal.

² Assistente Hospitalar Graduada de Neurologia, Centro Hospitalar de Coimbra, Portugal; Professora Auxiliar Convidada da FMUC – Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal.

Índice

Sumário.....	2
Palavras-chave.....	3
Abstract.....	4
Keywords.....	5
1. Introdução.....	6
2. Materiais e Métodos	9
2.1 População Estudada.....	9
2.2 Análise Genética.....	10
2.3 Análise Estatística	10
3. Resultados.....	11
4. Discussão e Conclusões.....	18
5. Bibliografia.....	23

Sumário

Introdução: Uma expansão hexanucleotídica no gene *C9ORF72* foi recentemente identificada como a causa genética mais frequente de Demência Lobar Fronto-Temporal (DLFT) e/ou Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). Esta descoberta revela a existência de um mecanismo fisiopatológico comum a estas duas doenças neurodegenerativas. Actualmente, diversos estudos têm sido realizados com o intuito de delinear as características clínicas, imagiológicas e patológicas associadas a esta mutação.

Objectivo: Analisar retrospectivamente as características clínicas distintas dos doentes e dos familiares nos quais foi identificada a expansão patogénica no laboratório de Neurogenética do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra.

Métodos: A pesquisa da expansão hexanucleotídica GGGGCC no gene *C9ORF72*, foi realizada no âmbito do Consórcio Europeu de Demência de início precoce (EOD-Consortium) e inclui doentes/familiares observados em duas Consultas de Neurologia de hospitais centrais. A informação relativa à idade de início, género, duração da doença, diagnóstico principal e variantes, história familiar bem como a evolução clínica foi facultada pelos médicos assistentes ao solicitar o estudo genético e complementada com a análise retrospectiva dos processos clínicos nos doentes em que foi identificada a mutação.

Resultados: A pesquisa da expansão foi realizada inicialmente num total de 129 indivíduos, 121 doentes (DLFT=104; DLFT-ELA=8; ELA=3; outras=6) e 8 familiares, tendo sido identificada em 15 doentes e em 6 familiares assintomáticos. Não se observou uma diferença significativa da idade média de início da doença e género entre os grupos de doentes com e sem expansão no *C9ORF72*. No entanto foi confirmada uma maior agregação familiar nos doentes com a expansão ($p=0.002$). Dos 15 doentes com a mutação,

10 (9,6%) estavam classificados como DLFT, 3 (37,5%) como DLFT-ELA e 2 (67%) como ELA. De notar que a maioria dos casos de DLFT e ELA apresentavam as formas DLFT variante comportamental (DLFTvc) e ELA bulbar (ELAb), respectivamente.

Discussão: Na nossa casuística, observou-se no grupo dos doentes com a mutação identificada uma grande heterogeneidade relativa à idade de início e à duração de doença, assim como um elevado pleomorfismo clínico quer inter quer intrafamiliar, confirmando-se no entanto que os fenótipos dominantes são as formas DLFTvc e ELAb isoladas ou em associação. É de referir que, no estudo presente, o espectro de apresentações clínicas associado à presença desta expansão patogénica foi alargado a um quadro de epilepsia criptogénica e de Doença de Paget, não descrito anteriormente.

Conclusões: A presença de história familiar de DLFT e/ou ELA nomeadamente sob as formas DLFTvc e ELAb isoladas ou em associação, em indivíduos jovens, são elementos que deverão alertar o clínico para a presença da mutação no gene *C9ORF72* e para um posterior estudo genético destas famílias.

Palavras-chave: degenerescência lobar frontotemporal; esclerose lateral amiotrófica; doenças neurodegenerativas; *C9ORF72*; fenótipo.

Abstract

Introduction: An expanded hexanucleotide repeat in the *C9ORF72* gene has been identified as the most frequent genetic cause for Frontotemporal lobar degeneration (FTLD) and/or Amiotrophic Lateral Sclerosis (ALS). This discovery reveals the existence of a physiopathological mechanism that is common to both of these neurodegenerative conditions. Several studies are being made with the purpose to trace the clinical, imagiological and pathological features associated to this mutation.

Goal: A retrospective analysis has been made focusing in the clinical features of the patients and their family members in whom the pathological expansion was found in the Neurogenetic laboratory in the Centre for Neurosciences and Cell Biology of Coimbra's University.

Methods: The search of the expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in *C9ORF72* gene was made in behalf of the European Early-Onset Dementia Consortium (EOD-Consortium) and included patients/family members seen in neurology appointments in primary hospitals. The information regarding age of onset, gender, disease duration, main diagnostic and subtypes, familial history, as well as clinical evolution, was given by the assistant doctor as they required the genetic study and complemented by a retrospective analysis of the clinical files of the patient in whom mutation was found.

Results: Initially, the search of the mutation was made in a total of 129 patients, 121 with disease (FTLD=104; FTLD-ALS=8; ALS=3; others=6) and 8 family members. The mutation was found in 15 patients and in 6 asymptomatic family members. There was no significative difference neither in the mean age of onset or in gender between the group with and the group without the expansion in *C9ORF72*. On the other hand, a significant familial clustering was confirmed in the patients with the expansion ($p=0.002$). Of the 15 patients with the mutation, 10 (9,6%) were classified DLFT, 3 (37,5%) as DLFT-ELA and

2 (67%) of them with ALS. It is noteworthy that most of the FTLN and ALS cases showed the subtypes of behaviour variant FTLN (FTLDbv) and bulbar ALS (ALSb), respectively.

Discussion: In our cohort, we found that patients with the mutation presented with a great heterogeneity regarding the age of onset and disease duration, as well as a wide variety of clinical presentation between families and even within the same family. We confirmed that the dominant phenotypes are FTLDbv and ALSb, either isolated or together. Of note that in this study, the spectrum of clinical features associated with the mutation was widened due to cases presenting cryptogenic epilepsy and Paget Disease, not reported before in association with *C9ORF72* expansion.

Conclusions: The presence of familiar history of FTLN and/or ALS, specially the subtypes FTLDbv and ALSb isolated or together, in young individuals, are key features that should alert the clinician to the presence of the *C9ORF72* gene mutation, leading to a genetic study of these families.

Keywords: frontotemporal lobar degeneration; amiotrophic lateral sclerosis; neurodegenerative disorders; *C9ORF72*; phenotype.

1. Introdução

A associação clínica entre a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) e a Degenerescência Lobar Fronto-temporal (DLFT) é reconhecida. Sabe-se que alguns doentes com ELA desenvolvem alterações cognitivas^{1,2} e a associação de Demência Frontal com ELA é classificada como uma variante clínica de DLFT de acordo com os critérios de diagnóstico^{3,4}. Especula-se, inclusivamente, se a DLFT e a ELA constituirão dois extremos de um mesmo espectro clínico, partilhando bases patológicas e genéticas^{5,6}.

A DLFT é a segunda causa mais frequente de demência pré-senil (após a Doença de Alzheimer), com uma prevalência de 15 casos em cada 100,000, nos indivíduos com idades compreendidas entre os 45 e os 65 anos^{7,8}. Afecta igualmente ambos os géneros e caracteriza-se habitualmente por alterações de comportamento, conduta social e problemas de linguagem. Existem três subtipos clínicos principais de DFTL: a Demência Fronto-temporal variante do comportamento (DFTLvc) é a forma de apresentação mais frequente e caracteriza-se por alterações do comportamento/personalidade e défice executivo, observando-se nas fases iniciais uma relativa preservação da memória e das funções visuo-perceptivas⁹; duas formas variantes de Afasia Primária Progressiva (APP), a qual pode ser fluente (APPf), ou não fluente (APPnf)^{10,11}. Em estadios mais avançados de doença, doentes com DLFT podem apresentar uma conjugação dos diversos subtipos clínicos, sendo também possível desenvolverem sintomas de doença do neurónio motor (DNM) ou de síndrome cortico-basal¹²⁻¹⁵. Aproximadamente 50% dos doentes com DLFT apresenta uma história familiar de demência ou alterações cognitivas e comportamentais relacionadas com a doença. Foram, até agora, identificados 3 genes principais (*MAPT*, *PGRN* e *C9ORF72*), que parecem explicar até 40% dos casos^{10,16,17}.

A ELA é uma doença neurodegenerativa fatal, caracterizada por uma paralisia insidiosa mas rapidamente progressiva, ocorrendo a morte aproximadamente entre 3 e 5

anos após o início dos sintomas, devido a falência respiratória¹⁸. Afecta 2 em cada 100.000 pessoas, constituindo a forma mais comum de doença progressiva do neurónio motor. É caracterizada por um atingimento seletivo e simultâneo dos neurónios motores central e periférico¹⁸. São descritas duas formas principais de apresentação: a ELA espinhal (ELAe), caracterizada por um atingimento muscular distal dos membros, com fraqueza progressiva, atrofia dos músculos interósseos e fasciculações; a forma bulbar (ELAb) manifesta-se essencialmente por disartria, disfagia, disfonia e atrofia com fasciculações da língua¹⁸. O componente central é comum a ambas as formas e manifesta-se por hiperreflexia miotática, reflexos cutâneo-plantares em extensão, eventualmente espasticidade e frequentemente incontinência emocional¹⁸. A ELA tem uma transmissão familiar em aproximadamente 5% dos casos, seguindo geralmente um padrão de transmissão autossómico dominante, conhecendo-se vários genes associados à doença (*SOD1*, *TARDBP* e *FUS*)¹⁹.

Em Outubro de 2011, dois grupos independentes, identificaram uma expansão de repetições de hexanucleótidos «GGGGCC», localizada na região intrónica do cromossoma 9, *open reading frame 72 (C9ORF72)*, aparentemente responsável pelo fenótipo em causa^{20,21}. Desde essa altura, vários coortes de doentes de diferentes regiões geográficas foram estudados para a presença desta expansão patogénica e verificou-se que esta mutação representa a causa genética mais comum de FLTD e ELA identificada até à data²⁰. Tendo em conta estes estudos, propôs-se que a forma de DLFT associada a mutações no *C9ORF72* possa ser qualitativamente distinta de outras formas de DLFT²². Na verdade, estes estudos mostraram um fenótipo bastante mais pleomórfico, descrevendo-se inclusivamente casos clinicamente muito semelhantes à Doença de Alzheimer²³, sendo igualmente proposta recentemente como a causa mais frequente de fenocópias de Doença de Huntington²⁴.

A mutação *C9ORF72* apresenta um padrão de transmissão autossómico dominante,

com elevada penetrância e dependente da idade (50% aos 58 anos e 100% em indivíduos aos 80 anos)^{9,25}. É, portanto, importante, sensibilizar os clínicos para as características fenotípicas associadas à expansão no gene *C9ORF72* de modo a que se possa oferecer uma melhor avaliação e seguimento dos doentes portadores.

Assim, o presente trabalho teve como objectivo fazer a análise retrospectiva as características clínicas distintivas dos doentes e dos familiares nos quais foi identificado a expansão patogénica do *C9ORF72* no laboratório de Neurogenética do CNC.

2. Materiais e Métodos

2.1 População Estudada

Os indivíduos incluídos neste estudo apresentam sintomatologia clínica no espectro da DLFT e ELA e foram referenciados pelas Consultas de Demência e de Patologia Neuromuscular do Serviço de Neurologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e do Serviço de Neurologia do Hospital São João, no Porto. O diagnóstico clínico de DLFT foi estabelecido por neurologistas experientes, de acordo com os critérios de Neary³, enquanto o diagnóstico de ELA se baseia nos critérios de El scoria²⁶. Todos os dados apresentados são baseados nas informações facultadas pelos médicos assistentes ao solicitar o estudo genético, sendo que nos doentes em que se identificou a mutação patogénica, estas informações foram complementadas com a análise retrospectiva dos processos clínico. Para cada doente foram descritas a idade de início, a duração da doença o género, o diagnóstico principal e variantes e a evolução clínica. No sentido de avaliar a probabilidade de uma causa genética, foi realizado a avaliação de Goldman, desenvolvido por Mahoney e colaboradores o qual se baseia na prevalência familiar de DLFT e/ou ELA e na idade de início da doença. Nos extremos desta avaliação estão os indivíduos que apresentam uma avaliação de Goldman de 1, que corresponde a uma família com DLFT ou ELA e padrão de transmissão autossómico dominante, onde a probabilidade de existir uma causa genética é superior a 80%; e os indivíduos com um avaliação de 4 (ausência de história familiar de DLFT ou ELA), indicando uma probabilidade de uma causa genética inferior a 5%.

2.2 Análise Genética

A pesquisa da expansão hexanucleotídica GGGGCC no gene *C9ORF72*, foi realizada no âmbito do Consórcio Europeu de Demência de início precoce (EOD-Consortium) e consistiu numa primeira fase na análise de fragmentos, *short tandem repeat* (STR) usando *primers* flanqueadores da região polimórfica das unidades repetidas G₄C₂ permitindo a determinação exacta do tamanho dos alelos normais. Todos os indivíduos que apresentavam apenas uma banda nos eletroferogramas resultantes da análise STR, foram de seguida analisados através de RP-PCR (*repeat-primed* PCR) que tem a capacidade de amplificar um alelo com a expansão, usando *primers* específicos marcados com fluorocromos²⁷. Ambos os produtos amplificados por STR ou RP-PCR foram analisados num Sequenciador automatizado (DNA Sequencer ABI PRISM 3130, Applied Biosystems), e o seu tamanho foi quantificado através de um *software* apropriado (Genemapper software, Applied Biosystems).

2.3 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada recorrendo ao programa *Statistical Package for the Social Sciences* (versão 18, PASWStatistics *software*). A comparação entre variáveis contínuas (idade de início) foi realizada usando o teste de Mann-Whitney U. O teste de Pearson's χ^2 foi usado para variáveis qualitativas (género e presença de história familiar).

3. Resultados

A pesquisa da expansão hexanucleotídica no gene *C9ORF72* foi realizada num total de 129 indivíduos, 121 doentes (DLFT=104; DLFT-ELA=8; ELA=3; outras=6) e 8 familiares. No coorte de doentes, 65 (40%) eram do género feminino, sendo a idade média de $59,0 \pm 8$ anos em que 32% dos casos apresentavam história familiar positiva (Quadro I). Este coorte, inclui 104 doentes com DLFT (tendo as formas diagnosticadas sido DLFTvc=82; variante afásicas=14; DLFT-Paget=1) e em 7 doentes não existiam informações clínicas suficientes para os categorizar. Dos doentes com envolvimento do neurónio motor, 3 apresentavam uma forma puramente neuromuscular, enquanto em 8 se confirmou a associação precoce de ELA e demência do tipo frontal. Os outros doentes apresentavam síndromes parkinsónicas (5 casos) e um caso de demência em associação com paraparésia.

A expansão patogénica foi identificada em 15 doentes (12,4%), sendo 6 (40%) do género feminino, com uma idade média de $59,3 \pm 7$ anos, tendo o doente mais jovem um início aos 47 anos e o mais idoso aos 73 anos. De notar que não se observou qualquer diferença significativa entre os doentes com e sem expansão relativamente ao género e à idade média de surgimento da doença. No entanto, no que diz respeito à presença de história familiar, a análise comparativa entre doentes que possuíam ou não a expansão (67% versus 27%) revelou uma diferença estatisticamente significativa ($p=0.002$), (Quadro I). Destes indivíduos com a mutação, 10 (9,6%) estavam classificados como DLFT, 3 (37,5%) dos casos de DLFT-ELA, 2 (67%) dos casos de ELA. Dos 10 casos DLFT, 9 estavam sub-classificados na variante clínica DLFTvc (11% dos casos com esta variante) e 1 caso único de DLFT-Paget possuía a mutação. Dos 6 casos de ELA associado ou não a DLFT, 6 apresentaram formas bulbares. De notar, que não foi identificada a expansão em

nenhum dos 14 doentes com as variantes afásicas, bem como nos 6 doentes com sintomatologia mais atípica e ainda nos 7 doentes com DLFT não classificada.

	Com expansão	Sem expansão	Total
	<i>C9ORF72</i>	<i>C9ORF72</i>	
<i>n</i>	15 (12%)	106 (88%)	121
Género (fem.)	6 (40%)	59 (56%)	65 (54%)
Idade	58,3 ± 7,0	59,1 ± 8,4	59,0 ± 8,0
História familiar +	10 (67%)	28 (27%)*	38 (32%)
Diagnóstico			
DLFT	10 (9,6%)	94 (90,4%)	104
ELA	2 (66,7%)	1 (33,4%)	3
ELA+DLFT	3 (37,5%)	5 (62,5%)	8
Outras	0 (0%)	6 (100%)	6

Quadro I - Dados numéricos da frequência da mutação, avaliação demográfica, história familiar e clínica apresentada dos casos neste coorte. * Teste do Qui-quadrado; $p=0.002$

No Quadro II estão apresentados os dados relativos aos 15 casos índice estudados. Neste coorte a duração média da doença foi de 7,8 anos, tendo como durações limite 2 e 14 anos. Aquando a escrita do texto, 5 dos doentes já tinham falecido e não existia informação disponível para o caso índice 12. Relativamente à história familiar, em 9 casos existia um familiar em primeiro grau afectado, sendo todos classificados (9/9) com avaliação de Goldman 1. Dois doentes eram aparentemente esporádicos (tendo sido classificados com avaliação de Goldman 4). De notar que em 4 casos não foi possível determinar a história familiar (Figura 1).

Caso/Familia	Sexo	Diagnóstico final	Idade primeiro sintoma	Duração da doença	Score de Goldman
1/Familia A	F	DLFTvc	53	10	1
2/Familia B	M	DLFTvc + PDB	57	2	1
3/Familia C	F	DLFTvc + ELAb	49	14	1
4	F	DLFTvc	48	6	4
5	M	ELAE + Epilepsia + Defeito de memória	65	7	1
6	M	DLFTvc + ELAb	49	vivo	1
7	M	DLFTvc	47	vivo	1
8	M	DLFTvc + ELAb	60	vivo	1
9	M	ELAb + alterações comportamentais	63	vivo	1
10	F	DLFTvc	59	viva	1
11	M	DLFTvc	58	?	4
12	M	DLFTvc	73	vivo	?
13	M	DLFTvc	57	vivo	?
14	F	DLFTvc	57	viva	?
15	F	DLFTvc	64	viva	?

Quadro II - Dados clínicos dos casos índice que apresentam a mutação *C9ORF72* Doença de Alzheimer (AD); Esclerose Lateral Amiotrófica variante bulbar (ELAb); Esclerose Lateral Amiotrófica variante espinhal (ELAE); Demência Lobar Frontotemporal variante comportamental (DLFTvc); Doença de Paget (PDB).

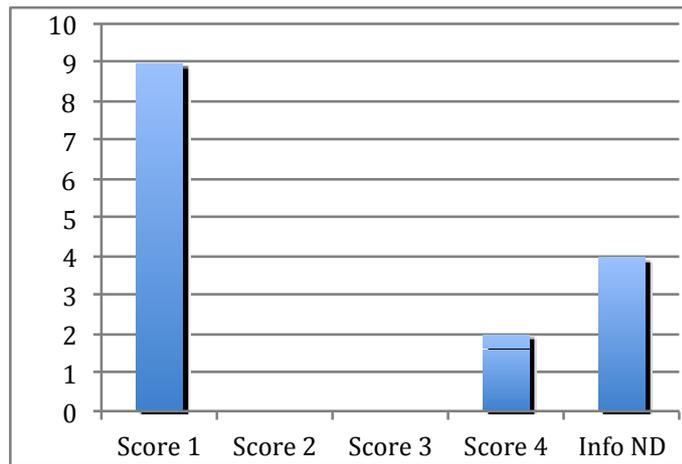


Figura 1: Avaliação de Goldman aplicado aos casos índice do coorte; informação não disponível (Info ND).

Após identificação da expansão patogénica no caso índice, o estudo molecular foi alargado a 8 familiares pertencentes a 3 famílias (2 DLFTvc; 1 DLFT-Paget) e a expansão foi encontrada em 6 indivíduos (75%). De notar que, todos os familiares ainda numa fase pré-sintomática, vieram referenciados de uma consulta de aconselhamento genético onde deram o seu consentimento informado de acordo com as Boas práticas vigentes relativas à realização de testes genéticos preditivos. Passamos agora a descrever com maior pormenor estas famílias e, como se verá, a apresentação clínica dos sintomas é heterogénea entre os doentes do coorte, assim como entre os indivíduos pertencentes à mesma família.

A Família A: O caso índice 1 apresentou clínica de DLFTvc aos 53 anos, falecendo 10 após o início dos sintomas, enquanto a sua irmã, também portadora da expansão, manifestou clínica de ELA, de início aos 46 anos, tendo falecido 2 anos depois. O seu irmão faleceu igualmente de ELA, aos 49 anos, enquanto a sua mãe apresentou um quadro de ELA+DLFTvc, que se iniciou aos 56 anos. De referir ainda a presença de demência de início tardio na sua avó materna (Figura 2).

Família B: A partir do caso índice 2 foram estudados 6 familiares, 4 dos quais portadores da expansão patogénica no *C9ORF72*. O caso índice apresentou um fenótipo de

DLFTvc aos 57 anos, associado a uma doença de Paget (PDB), falecendo 2 anos após o início dos sintomas. A mãe (II1), manifestou sintomatologia compatível com DLFT e eventualmente parkinsonismo e o seu avô (I2) faleceu aos 50 anos num hospital psiquiátrico com um quadro de demência com alterações paranóides. De notar, que um dos seus tios (II3), era seguido na Consulta de Demência por apresentar defeito de memória e uma sintomatologia compatível com Doença de Alzheimer; após a identificação da mutação *C9ORF72* no sobrinho (III2), efetuou uma Tomografia de Positrões com um marcador específico para amilóide (PIB-PET), que demonstrou a ausência de placas deste peptídeo e posteriormente demonstrou-se que também era portador da expansão. Dos 5 irmãos do caso índice, 3 são portadores aparentemente assintomáticos. Curiosamente nesta família foi identificada a mutação, P392L no gene *SQSTM1* que segrega com a doença de Paget (afecta 3 indivíduos da terceira geração), pelo que nesta família existem 2 casos (um deles o caso índice) de associação de mutações - a expansão no gene *C9ORF72* e a mutação P392L no gene *SQSTM1* (Figura 2).

Família C: além do caso índice 3, foi estudada uma filha demonstrando-se ser portadora mas assintomática. A doente apresentava uma clínica de DLFTvc e ELAb, que se iniciou quando tinha 49 anos, falecendo 14 anos após o início da doença. Como antecedentes familiares de salientar que o seu irmão tinha falecido aos 53 anos com um quadro demencial, alteração da linguagem e tetraparesia e a sua mãe faleceu com um quadro de diminuição de força generalizada, não estando a idade referida no processo.

Relativamente aos doentes com história familiar aparentemente positiva, mas sem confirmação genética nos familiares, os casos índice estão referenciados no Quadro II com os números: 5, 6, 7, 8, 9 e 10. De notar que nestes casos existe uma elevada prevalência de ELA nos familiares.

O caso índice 5, com antecedentes de epilepsia tardia, desenvolveu aos 65 anos,

mais ou menos simultaneamente ELAe e defeito cognitivo amnésico, vindo a falecer 7 anos após o início da doença. Como antecedentes familiares, de salientar a presença de um quadro de DLFT+ELA no avô paterno e no pai, ambos com início em por volta dos 60 anos.

O caso índice 6 manifestou sintomas compatíveis com DLFTvc aos 49 anos, e por volta dos 60 anos desenvolveu um quadro de disfagia, bradicinésia, hipomímia e tremor postural associados a espasticidade nos quatro membros, mas sem disfunção do neurónio motor. Pode assim ser classificada de ELAb com grande envolvimento do 1º neurónio. A nível familiar, tanto o seu pai como a sua tia paterna tinham uma clínica de DLFTvc, que teve início em ambos aos 60 anos.

O caso índice 7, apresenta um quadro de DLFTvc que se iniciou quando o doente tinha 47 anos, tendo a sua mãe falecido de ELA (com início dos sintomas aos 50 anos e morte após 5 anos).

O caso índice 8, apresenta uma clínica de DLFTvc e de ELAb, que se iniciou aos 60 anos, manifestando-se inicialmente sob a forma de ELAe, evoluindo progressivamente para a forma bulbar. Aos 63 anos o doente passou a apresentar um quadro de comportamentos impulsivos e agressivos. A nível familiar, de salientar que tanto a sua irmã como a sua mãe (já falecida) foram diagnosticadas com um quadro de ELA.

O caso índice 9, apresenta um quadro de ELAe com início aos 60 anos e apatia/alterações comportamentais que se manifestaram 5 anos após o diagnóstico de ELA. Um dos seus irmãos tinha já falecido com um perfil clínico de ELA idêntico, suspeitando-se do diagnóstico de ELA num outro irmão. Os seus pais, ambos já falecidos, eram aparentemente saudáveis.

O caso índice 10, tem uma DLFTvc que se iniciou por volta dos 59 anos, tendo a sua mãe também sido diagnosticada com DLFTvc, com início aos 65 anos.

Relativamente aos casos aparentemente esporádicos, o caso índice 4, desenvolveu DLFTvc aos 48 anos; 5 anos após o diagnóstico apresentava um quadro de mutismo e de comportamento estereotipado, falecendo 7 anos após o diagnóstico inicial.

O caso índice 11, foi referenciado pela psiquiatria por apresentar inicialmente (aos 58 anos) e no decurso da doença, sintomas psicóticos. Posteriormente associou características cognitivas e comportamentais compatíveis com DLFTvc.

Os casos índice de 12 a 15, foram classificados de DLFTvc mas não há informação concreta sobre a respectiva história familiar.

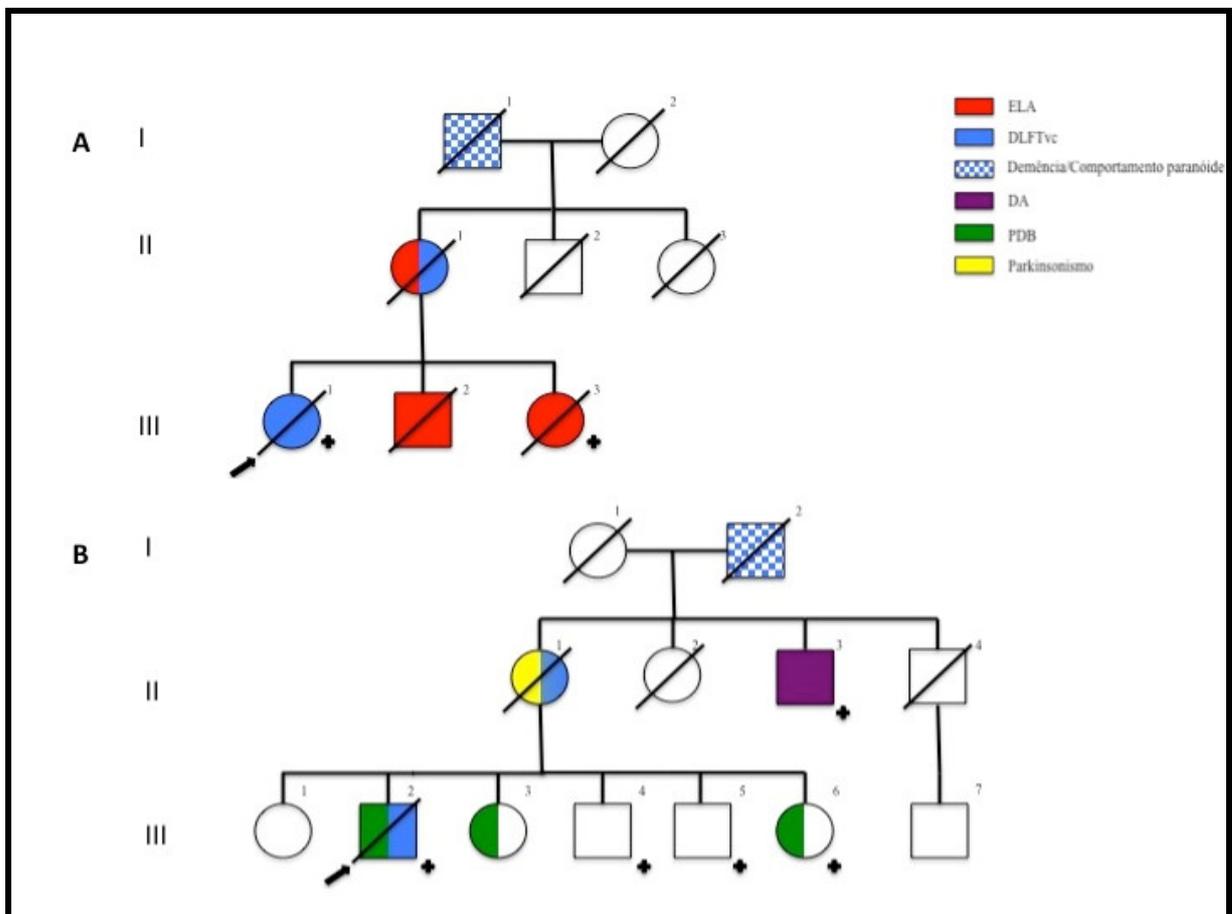


Figura 2: Árvores genealógicas das famílias do caso #1 (Família A) e dos casos índice #2 (Família B). Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA); Demência Fronto-Temporal variante do comportamento (DLFTvc); Doença de Alzheimer (DA); Doença de Paget (PDB); portador da mutação *C9ORF72* (+).

4. Discussão e Conclusões

O presente estudo foca-se no fenótipo clínico associado à expansão no *C9ORF72*. Esta mutação foi descrita muito recentemente e só agora se começam a identificar os fenótipos mais típicos, bem como o mecanismo patológico associado. O aspecto mais relevante desta mutação, é ter sido pela primeira vez descrita uma expansão nucleotídica na DLFT e na ELA. Assim estas situações passam a constar da classe de patologias causadas por expansão de unidades repetidas em regiões não codificantes²⁸. A proteína codificada pelo *C9ORF72* não foi ainda bem caracterizada, sabendo-se, contudo, que está bem conservada ao longo da evolução das espécies, tem uma localização preferencial no citoplasma e sinapses neuronais²⁰ e expressa-se nas regiões do sistema nervoso onde se encontram as alterações patológicas características de ELA e da DLFT. Observou-se que o número máximo de repetições nos controlos saudáveis é de 2-23 unidades²⁰, enquanto nos portadores da expansão G₄C₂, o número de repetições será entre 700-1600, tendo sido estes resultados obtidos através de técnicas de FISH e de Southern Blot^{20,21}. Não existe até ao momento evidências de que o tamanho da expansão tenha implicações no fenótipo, quer em termos de domínios sintomáticos, quer de gravidade (idade de início e tempo de evolução)²⁹.

Embora, como dissemos, o conhecimento do espectro sintomático da expansão ainda seja limitado, os portadores da mutação *C9ORF72* apresentam geralmente uma idade de início de doença entre os 43-68 anos, sem diferença de género, com uma duração clínica que vai desde os 1.6 a mais de 22 anos³⁰. Por outro lado, sabe-se que a penetrância é dependente da idade (50% aos 58 anos e 100% em indivíduos aos 80 anos)^{9,25}. No presente estudo confirma-se que a grande maioria dos doentes (sem discrepância de género) são efectivamente jovens (idade média 58 anos); no entanto no nosso coorte existe um caso em

que os sintomas se iniciaram muito tardiamente (80 anos). Relativamente à duração da doença, em média foi de 7,8 anos, mas, tal como na literatura, com uma ampla variação (entre 2 e 14 anos). Deve também salientar-se que, tal como acontece para os outros genes associados à DLFT, também se confirmou uma maior agregação familiar nos casos com mutação no *C9ORF72*.

É importante referir que na literatura é notada uma grande heterogeneidade clínica inter e intrafamiliar³¹⁻³⁴, embora alguns autores apontem para uma convergência de fenótipos à medida que a doença evolui⁹. Esta heterogeneidade está bem patente na nossa casuística: 9 doentes foram classificados com diagnóstico de DLFTvc, 3 com o diagnóstico de DLFTvc+ELAb, 1 com diagnóstico de ELAe+Epilepsia+DLFTvc, 1 com o diagnóstico de ELAb associado a alterações comportamentais, nomeadamente apatia, e 1 com o diagnóstico de DLFTvc+PDB.

Por outro lado, na literatura é referido que cerca de 60% dos casos manifesta pelo menos algumas características clínicas de ELA ao longo do *follow-up*. Os casos de ELA com mutação *C9ORF72* parecem apresentar algumas características distintivas, nomeadamente com um início da doença mais tardio, comparativamente aos restantes grupos de causa genética, mas com uma forma de doença mais agressiva (menor esperança de vida)³⁵; um início e predomínio de envolvimento bulbar e a associação a DLFT³⁶. A nossa casuística reproduz estas evidências. Salientamos que embora o número de casos seja reduzido, a mutação foi encontrada em 67% dos casos índice, o que está de acordo com a literatura; mais importante, este diagnóstico é transversal à maioria das famílias, uma vez que em 78% das famílias descrita há casos de ELA; nalguns casos, também como referido, o envolvimento do neurónio motor manifestou-se durante o decurso da doença (pelo menos em dois casos); relativamente à forma de ELA, 6/7 dos casos observados apresentavam a

variante bulbar da doença, mas a associação com DLFT não foi mais frequente no grupo com expansão comparativamente aos restantes.

Existem ainda fenótipos menos frequentemente encontrados que sugerem a associação de outras formas de demência na presença da expansão. Por exemplo identificaram-se doentes com o diagnóstico de Doença de Alzheimer (DA) portadores da mutação *C9ORF72*, os quais foram posteriormente reclassificados como DLFT após realização de biópsia ou de estudo *post-mortem*. No nosso coorte identificámos um doente com defeito de memória e com evolução compatível com o diagnóstico de DA que se demonstrou ser portador da expansão, sendo que o (PIB-PET) também a ausência de depósitos de amiloide. Esta variante amnésica de DLFT deve ser valorizada no diagnóstico diferencial com a DA²³, sendo especialmente importante avaliar a presença da expansão do gene do *C9ORF72* em doentes que tenham uma forte história familiar (como no nosso caso) e nos quais não tenham sido identificadas as mutações nos genes associados à DA (Presinilinas 1 e 2 e APP)²³. Deve, no entanto, salientar-se que estudos realizados em coortes de Doença de Alzheimer mostraram que a mutação do *C9ORF72* não é uma causa comum, estando associada a <1% dos casos^{27,37}.

Outro dado semiológico sugestivo é a presença *ab initium* de um comportamento ansioso e agitado³⁸, assim como, sintomas psicóticos (alucinações e ideias paranóides)^{30,38,39}. De referir que na ausência da mutação, a psicose é rara, sendo apenas descrita em doentes com mutação no gene FUS (também associado a ELA)^{30,40,41}. Os comportamentos repetitivos, resultado de um distúrbio obsessivo-compulsivo são também mais frequentemente encontrados nos portadores da mutação *C9ORF72*^{42,43}, sendo que alguns autores os consideram raros nos doentes que a não possuam⁴². O nosso caso índice 11 foi referenciado da Psiquiatria onde era seguido por psicose de início tardio. De

salientar que na família B também foram relatados casos que apresentaram sintomas psicóticos.

Por outro lado, nenhum dos 5 casos da nossa casuística com S. Parkinsónicos apresentava a mutação, um facto que parece ser corroborado noutras séries, uma vez que este tipo de sintomas só é salientado num coorte⁴⁴.

A nossa casuística apresenta alguns dados novos, já que o espectro clínico parece ser mais abrangente, relativamente ao apresentado por outros grupos. Com efeito, não existem, até a data, outros casos que associem a presença da mutação *C9ORF72* a epilepsia, sendo que no nosso doente (caso índice 5) teve um início tardio, era aparentemente criptogénica e associava-se a dois domínios sintomáticos: defeito amnésico e ELA. Por outro lado, o fenótipo expressado pelo caso índice 2, ou seja, a associação de DLFTvc e PDB, é também uma novidade, embora possa ser explicada pela concomitância com outra mutação a nível do cromossoma 5 que se sabe que é responsável pela clínica de PDB⁴⁵.

Em conclusão, muitos dos aspectos observados neste coorte estão de acordo com os descritos na literatura, salientando-se a grande heterogeneidade da idade de início e quanto à duração de doença, assim como uma grande pleomorfismo na apresentação clínica quer inter-familiar quer dentro da mesma família. No entanto confirmam-se os fenótipos dominantes de DLFTvc e ELAb isoladas ou em associação com a expansão. Estas formas de apresentação, em indivíduos jovens e com história familiar, são elementos que deverão alertar o clínico para a presença da mutação no gene *C9ORF72* e para um posterior estudo genético destas famílias.

A principal limitação deste trabalho é o tamanho reduzido da nossa amostra, o que poderá resultar em que um fenótipo com uma representação significativa no nosso estudo se torne menos relevante quando se analisa numa casuística robusta. Contudo, é importante

realçar que esta mutação foi identificada apenas há dois anos e que portanto todas informações relativas à relação genótipo/fenótipo, mesmo que com algum enviesamento, são cruciais e contribuem para um melhor conhecimento da fisiopatologia da doença.

5. Bibliografia

1. Phukan J, Pender NP, Hardiman O. Cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* 2007;6(11):994–1003.
2. Strong MJ, Grace GM, Freedman M, et al. Consensus criteria for the diagnosis of frontotemporal cognitive and behavioural syndromes in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler.* 2009;10(3):131–46.
3. Neary D, Snowden JS, Gustafson L, et al. Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology.* 1998;51(6):1546–54.
4. Seelaar H, Schelhaas HJ, Azmani A, et al. TDP-43 pathology in familial frontotemporal dementia and motor neuron disease without Progranulin mutations. *Brain.* 2007;130(Pt 5):1375–85.
5. Talbot PR, Goulding PJ, Lloyd JJ, Snowden JS, Neary D, Testa HJ. Inter-relation between “classic” motor neuron disease and frontotemporal dementia: neuropsychological and single photon emission computed tomography study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1995;58(5):541–7.
6. Murphy JM, Henry RG, Langmore S, Kramer JH, Miller BL, Lomen-Hoerth C. Continuum of frontal lobe impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol.* 2007;64(4):530–4.
7. Neary D, Snowden J, Mann D. Frontotemporal dementia. *Lancet Neurol.* 2005;4(11):771–80.
8. McKhann GM, Albert MS, Grossman M, Miller B, Dickson D, Trojanowski JQ. Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick’s Disease. *Arch Neurol.* 2001;58(11):1803–9.
9. Hsiung G-YR, DeJesus-Hernandez M, Feldman HH, et al. Clinical and pathological features of familial frontotemporal dementia caused by C9ORF72 mutation on chromosome 9p. *Brain.* 2012;135(Pt 3):709–22.
10. Graff-Radford NR, Woodruff BK. Frontotemporal dementia. *Semin Neurol.* 2007;27(1):48–57.
11. Ratnavalli E, Brayne C, Dawson K, Hodges JR. The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology.* 2002;58(11):1615–21.
12. Lomen-Hoerth C, Anderson T, Miller B. The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Neurology.* 2002;59(7):1077–1079.

13. Kertesz A, Nadkarni N, Davidson W, Thomas AW. The Frontal Behavioral Inventory in the differential diagnosis of frontotemporal dementia. *J Int Neuropsychol Soc.* 2000;6(4):460–8.
14. Kertesz A, McMonagle P, Blair M, Davidson W, Munoz DG. The evolution and pathology of frontotemporal dementia. *Brain.* 2005;128(Pt 9):1996–2005.
15. Boeve BF, Boylan KB, Graff-Radford NR, et al. Characterization of frontotemporal dementia and/or amyotrophic lateral sclerosis associated with the GGGGCC repeat expansion in C9ORF72. *Brain.* 2012;135(Pt 3):765–83.
16. Rohrer JD, Warren JD, Modat M, et al. Patterns of cortical thinning in the language variants of frontotemporal lobar degeneration. *Neurology.* 2009;72(18):1562–9.
17. Rohrer JD, Warren JD. Phenotypic signatures of genetic frontotemporal dementia. *Curr Opin Neurol.* 2011;24(6):542–9.
18. Longo D, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Jameson J, Loscalzo J. Harrison's Principles of Internal Medicine. 18th ed. McGraw-Hill; 2011.
19. Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, et al. NIH Public Access. 2011;81(4):385–390.
20. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron.* 2011;72(2):245–56.
21. Renton AE, Majounie E, Waite A, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron.* 2011;72(2):257–68.
22. Snowden JS, Rollinson S, Thompson JC, et al. frontotemporal dementia associated with C9ORF72 mutations. 2012.
23. Harms M, Benitez B a, Cairns N, et al. C9orf72 hexanucleotide repeat expansions in clinical Alzheimer disease. *JAMA Neurol.* 2013;70(6):736–41.
24. Hensman Moss DJ, Poulter M, Beck J, et al. C9orf72 expansions are the most common genetic cause of Huntington disease phenocopies. *Neurology.* 2014;82(4):292–9.
25. Majounie E, Renton AE, Mok K, et al. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol.* 2012;11(4):323–30.
26. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2000;1(5):293–9.

27. Cacace R, Van Cauwenberghe C, Bettens K, et al. C9orf72 G4C2 repeat expansions in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*. 2013;34(6):1712.e1–7.
28. Todd PK, Paulson HL. RNA-mediated neurodegeneration in repeat expansion disorders. *Ann Neurol*. 2010;67(3):291–300.
29. Benussi L, Rossi G, Glionna M, et al. C9ORF72 hexanucleotide repeat number in frontotemporal lobar degeneration: a genotype-phenotype correlation study. *J Alzheimers Dis*. 2014;38(4):799–808.
30. Snowden JS, Rollinson S, Thompson JC, et al. Distinct clinical and pathological characteristics of frontotemporal dementia associated with C9ORF72 mutations. *Brain*. 2012;135(Pt 3):693–708.
31. Vance C, Al-Chalabi A, Ruddy D, et al. Familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia is linked to a locus on chromosome 9p13.2-21.3. *Brain*. 2006;129(Pt 4):868–76.
32. Gijssels I, Engelborghs S, Maes G, et al. Identification of 2 Loci at Chromosomes 9 and 14 in a Multiplex Family With Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. 2010;(May):1–15.
33. Pearson JP, Williams NM, Majounie E, et al. Familial frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis and a shared haplotype on chromosome 9p. *J Neurol*. 2011;258(4):647–55.
34. Boxer AL, Mackenzie IR, Boeve BF, et al. Clinical, neuroimaging and neuropathological features of a new chromosome 9p-linked FTD-ALS family. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011;82(2):196–203.
35. Cooper-Knock J, Hewitt C, Highley JR, et al. Clinico-pathological features in amyotrophic lateral sclerosis with expansions in C9ORF72. *Brain*. 2012;135(Pt 3):751–64.
36. Stewart H, Rutherford NJ, Briemberg H, et al. Clinical and pathological features of amyotrophic lateral sclerosis caused by mutation in the C9ORF72 gene on chromosome 9p. *Acta Neuropathol*. 2012;123(3):409–17.
37. Kohli M a, John-Williams K, Rajbhandary R, et al. Repeat expansions in the C9ORF72 gene contribute to Alzheimer's disease in Caucasians. *Neurobiol Aging*. 2013;34(5):1519.e5–12.
38. Mahoney CJ, Beck J, Rohrer JD, et al. Frontotemporal dementia with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: clinical, neuroanatomical and neuropathological features. *Brain*. 2012;135(Pt 3):736–50.
39. Arighi A, Fumagalli GG, Jacini F, et al. Early onset behavioral variant frontotemporal dementia due to the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: psychiatric clinical presentations. *J Alzheimers Dis*. 2012;31(2):447–52.

40. Seelaar H, Klijnsma KY, de Koning I, et al. Frequency of ubiquitin and FUS-positive, TDP-43-negative frontotemporal lobar degeneration. *J Neurol*. 2010;257(5):747–53.
41. Urwin H, Josephs K a, Rohrer JD, et al. FUS pathology defines the majority of tau- and TDP-43-negative frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol*. 2010;120(1):33–41.
42. Bathgate D, Snowden JS, Varma A, Blackshaw A, Neary D. Behaviour in frontotemporal dementia, Alzheimer’s disease and vascular dementia. *Acta Neurol Scand*. 2001;103(6):367–78.
43. Mateen FJ, Josephs KA. The clinical spectrum of stereotypies in frontotemporal lobar degeneration. *Mov Disord*. 2009;24(8):1237–40.
44. O’Dowd S, Curtin D, Waite AJ, et al. C9ORF72 expansion in amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia also causes parkinsonism. *Mov Disord*. 2012;27(8):1072–4.
45. Rubino E, Rainero I, Chiò A, et al. SQSTM1 mutations in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2012;79(15):1556–62.