

**Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”**

**UNIGRANRIO**

**MARIA CLARA BARON SILVA RAMOS**

**A ANÁLISE MOLECULAR DO GENE *UBQLN2* NA CAUSA DA ESCLEROSE  
LATERAL AMIOTRÓFICA EM PACIENTES DO RIO DE JANEIRO**

**RIO DE JANEIRO**

**2025**

Maria Clara Baron Silva Ramos

Coorientador: Rafaela de Freitas Martins Felício

Orientador: Verônica Marques Zembrzusi

**Análise molecular do gene *UBQLN2* na causa da  
esclerose lateral amiotrófica em pacientes do Rio de  
Janeiro**

Projeto de pesquisa apresentado  
como requisito para aprovação na  
disciplina de Trabalho de  
Conclusão I do Curso de  
Biomedicina da Universidade do  
Grande Rio (UNIGRANRIO).

**RIO DE JANEIRO 2025**

**MARIA CLARA BARON SILVA RAMOS**

**A ANÁLISE MOLECULAR DO GENE *UBQLN2* NA CAUSA DA ESCLEROSE  
LATERAL AMIOTRÓFICA EM PACIENTES DO RIO DE JANEIRO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade do Grande Rio "Prof. José de  
Souza Herdy", como requisito parcial para a  
obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Coorientador: Rafaela de Freitas Martins  
Felício

Orientador: Verônica Marques Zembrzuski

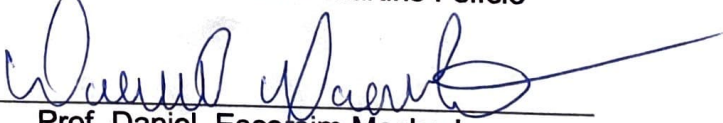
Aprovada em:

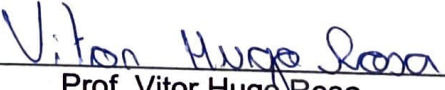
Barra da Tijuca, \_14\_ de \_Novembro\_ de 2025.

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Verônica Marques Zembrzuski

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Rafaela de Freitas Martins Felício

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Daniel Escorsim Machado

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Vitor Hugo Rosa

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a minha família, por toda a força, apoio e amor que foram essenciais. Agradeço em especial a minha irmã, Manoela, por sempre estar ao meu lado independente de tudo, não chegaria até aqui sem você.

A minha orientadora Verônica Marques Zembrzuski e a coorientadora Rafaela de Freitas Martins Felício por todo conhecimento e por me guiar, tornando possível o desenvolvimento desse projeto.

Agradeço a todos do LGH, laboratório de Genética Humana na Fiocruz, em especial a Cléo, Cláudia e Mário, por toda paciência e apoio na minha trajetória.

Agradeço à FAPERJ, pelo apoio financeiro concedido por meio da bolsa de iniciação científica, que possibilitou a realização deste trabalho

Aos meus amigos, que estão sempre comigo, obrigada por fazerem parte da minha vida, amo vocês.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Distribuição percentual dos pacientes de acordo com o estado de nascimento.....	10
<b>Figura 2</b> Distribuição percentual dos pacientes segundo o sexo, sendo representados em amarelo os pacientes do sexo masculino e em verde os pacientes do sexo feminino .....	11
<b>Figura 3</b> Distribuição percentual dos pacientes com ELA, de acordo com a forma de apresentação da doença, mostrando a proporção de casos familiares e esporádicos.....	11

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Sequências dos oligonucleotídeos desenhados para o gene <i>UBQLN2</i> , utilizadas para amplificação e análise das regiões de interesse.....	6
<b>Tabela 2</b> Condições utilizadas para a amplificação das regiões/exões do gene <i>UBQLN2</i> por PCR.....	6
<b>Tabela 3</b> Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na reação de PCR convencional para amplificação do gene <i>UBQLN2</i> , detalhando cada componente da mistura e suas respectivas quantidades.....	7
<b>Tabela 4</b> Ciclagens utilizadas para padronização da PCR.....	7
<b>Tabela 5</b> Variantes identificadas no gene <i>UBQLN2</i> nos pacientes analisados, incluindo ID do paciente, alteração proteica, troca de bases e éxon correspondente. ....	12
<b>Tabela 6</b> Variantes de significado incerto em genes associados à ELA na paciente ALS 84, apresentando informações sobre a sequência alterada e o éxon afetado.....	12
<b>Tabela 7</b> Variantes benignas da paciente ALS 84, com gene, alteração genética e classificação dos preditores in silico.....	13

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1	CARACTERÍSTICAS .....	1
1.2	CLASSIFICAÇÕES.....	1
1.3	EPIDEMIOLOGIA .....	1
1.4	FISIOPATOLOGIA DA ELA.....	2
1.5	GENES ASSOCIADOS À ELA.....	2
1.6	UBQLN2.....	3
1.7	JUSTIFICATIVA.....	4
1.8	OBJETIVOS.....	4
<b>2</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>5</b>
2.1	COLETA E EXTRAÇÃO .....	5
2.2	ANÁLISE MOLECULAR .....	5
2.2.1	DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS .....	5
2.2.2	PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE) E PURIFICAÇÃO .....	6
2.2.3	SEQUENCIAMENTO DE SANGER.....	8
2.2.4	SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO EXOMA.....	8
2.3.1	ANÁLISE DAS MUTAÇÕES.....	9
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>10</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>19</b>

# A ANÁLISE MOLECULAR DO GENE *UBQLN2* NA CAUSA DA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA EM PACIENTES DO RIO DE JANEIRO

Maria Clara Baron Silva Ramos<sup>1</sup>

Rafaela de Freitas Martins Felício<sup>2</sup>

Verônica Marques Zembrzusi<sup>3</sup>

## RESUMO

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa progressiva e fatal caracterizada pela degeneração dos neurônios motores, resultando em atrofia e paralisia muscular, sendo que a maioria das terapias atuais são paliativas, então quanto mais informações genéticas forem conhecidas, mais específicos poderão ser os tratamentos e maiores serão as chances de uma melhor qualidade de vida. Um dos diversos genes identificados como responsáveis pela disfunção da rede neural é o *UBQLN2*. Neste contexto, este estudo teve como objetivo analisar a sequência codificadora do gene *UBQLN2* em 87 pacientes com Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) da população do Rio de Janeiro, utilizando sequenciamento de sanger e sequenciamento completo do exoma. Os resultados revelaram predominância de casos esporádicos (77,8%), distribuição equilibrada entre os sexos e idade média de início dos sintomas de 53 anos. Apenas uma paciente apresentou uma variante possivelmente inédita no gene *UBQLN2* (p.Gly479Val), associada a início precoce e evolução agressiva da doença, enquanto os demais pacientes apresentaram apenas variantes benignas ou polimorfismos. A correlação entre genótipo e fenótipo sustentou a hipótese de que a mutação identificada seja causal para o quadro clínico observado. Conclui-se que, embora alterações no *UBQLN2* sejam raras, sua identificação é relevante para o diagnóstico diferencial, aconselhamento genético e desenvolvimento de terapias personalizadas. O estudo reforça a importância da análise genético-molecular como ferramenta complementar ao diagnóstico clínico da ELA no Brasil.

**Palavras-chave:** Esclerose Lateral Amiotrófica. *UBQLN2*. Mutações Genéticas. Sequenciamento.

## ABSTRACT

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a progressive and fatal neurodegenerative disease characterized by the degeneration of motor neurons, resulting in muscle atrophy and paralysis. Most current therapies are palliative, so the more genetic information is available, the more targeted the treatments can be, increasing the chances of improved quality of life. Among the various genes identified as responsible for disrupting neural network is *UBQLN2*. In this context, this study aimed to analyze the coding sequence of the *UBQLN2* gene in 87 ALS patients from the population of Rio de Janeiro, using Sanger sequencing and whole-exome sequencing. The results showed a predominance of sporadic cases (77.8%), balanced sex distribution, and an average age of symptom onset of 53 years. Only one patient presented a potentially novel variant in the *UBQLN2* gene (p.Gly479Val), associated with early onset and aggressive disease progression, while the remaining patients presented only benign variants or polymorphisms. The genotype-phenotype correlation supported the hypothesis that the identified mutation is causal for the observed clinical presentation. It is concluded that although alterations in *UBQLN2* are rare, their identification is relevant for differential diagnosis, genetic counseling, and the development of personalized therapies. The study reinforces the importance of genetic-molecular analysis as a complementary tool to the clinical diagnosis of ALS in Brazil.

**Keywords:** Amyotrophic Lateral Sclerosis. *UBQLN2*. Genetic Mutations. DNA Sequencing.

<sup>1</sup> Graduanda do curso de Biomedicina na Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO.

<sup>2</sup> Biomédica – UFMT, Mestre em imunologia básica e aplicada pela faculdade de medicina - USP/RP e Doutorado em Biociências e biotecnologia – USP/RP – Pós Doutorado no LEMC, Fiocruz

<sup>3</sup> Bióloga - Doutorado em Ciências (Genética e Biologia Molecular) – UFRGS, Graduação em Ciências Biológicas – UFRGS – Pesquisadora LGH, Fiocruz



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CARACTERÍSTICAS

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa progressiva e fatal, com uma sobrevida típica de apenas 2 a 5 anos a partir do diagnóstico (GOUTMAN S et al., 2023). É caracterizada pela degeneração dos neurônios motores no cérebro e na medula espinhal, levando à atrofia e paralisia muscular (TOZANI, F. DE D.; SIQUEIRA.; 2023). As causas da ELA são multifatoriais, portanto, por uma combinação de fatores genéticos/biológicos e ambientais, como tabagismo, IMC, exercício físico, sua etiologia se torna difícil (MASRORI; VAN DAMME, 2020.).

## 1.2 CLASSIFICAÇÕES

A ELA pode ser classificada devido à origem da doença, que distingue os casos esporádicos daqueles familiares, e o fenótipo clínico, que descreve as diferentes manifestações da doença. Estima-se que entre 90% a 95% dos casos de Esclerose Lateral Amiotrófica sejam esporádicos (ELAe), enquanto 5% a 10% são familiares (ELAf) (AGNELLO L. e CIACCIO M., 2022; SEVER B., et al., 2022). Quanto ao fenótipo clínico, comumente aos 55 anos de idade os pacientes apresentam as primeiras manifestações (LAIS ,2023), que podem variar conforme os grupos musculares inicialmente afetados e o padrão de progressão da doença. As manifestações mais comuns da doença podem incluir a forma espinhal, que provoca fraqueza nos membros; a bulbar, que prejudica a fala e a deglutição; a respiratória, que compromete os músculos responsáveis pela respiração; a piramidal, marcada por dificuldades de coordenação motora e rigidez muscular; a flácida, associada à atrofia muscular e fraqueza; e, finalmente, a forma com Demência Frontotemporal, caracterizada por alterações cognitivas e comportamentais (FELDMAN E et al., 2022).

## 1.3 EPIDEMIOLOGIA

Estima-se que a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) afete cerca de 140 mil pessoas em todo o mundo a cada ano, com uma prevalência global em 4,5 casos por 100 mil habitantes (WOLFSON et al., 2023). No Brasil, sua taxa de incidência é de 1,5 casos a cada 100 mil habitantes, o que corresponde a aproximadamente 2.500 novos pacientes por ano (ABrELA). A ELA impacta a

qualidade de vida dos pacientes e representa um alto custo financeiro para famílias e o sistema de saúde; o custo médio por internação foi de R\$ 7.091,40 por paciente em 2021 (*Instituto de estudos de saúde suplementar IESS*), e os gastos com tratamento ultrapassam dezenas de milhares de reais. Embora o SUS forneça tratamento gratuito para os pacientes, o custo total de cuidado da doença ainda é muito elevado para o sistema de saúde público (*IESS*).

#### 1.4 FISIOPATOLOGIA DA ELA

A fisiopatologia da ELA é complexa e pouco conhecida (*MOULJALLED D et al., 2021*); vários processos moleculares têm se associado a essa patologia como: estresse oxidativo, excitotoxicidade e disfunção mitocondrial (*GOUTMAN S et al., 2023*). Uma das principais características da ELA, patologicamente, é a degeneração dos tratos bulbar e espinhal, acompanhada da perda progressiva dos corpos celulares dos neurônios motores superiores e inferiores, o que leva ao comprometimento dos axônios e a falha na transmissão dos sinais motores (*MEAD R et al., 2023*). O diagnóstico da ELA é desafiador, principalmente porque não existe um teste específico para a doença. Inicialmente, é realizado por meio da análise clínica e do exame físico, que podem evidenciar sinais e sintomas, bem como deficiências físicas relacionadas à condição. Para complementar o diagnóstico, são solicitados exames adicionais, como eletroneuromiografia, exames de sangue e punção lombar (*GODOY et al., 1991*).

Em aproximadamente 97% dos pacientes a ELA, é uma proteinopatia, da proteína TDP-43, resultando em processos de agregação citoplasmática; em formas mais raras, proteínas como FUS e SOD1 também podem estar envolvidas (*NEUMANN M, et al., 2006*). O principal biomarcador é a agregação proteica. A lesão dos neurônios motores na ELA é consequência da interação entre esses múltiplos mecanismos fisiopatológicos, que resultam em uma disfunção generalizada da rede neural (*MSD MANUALS, 2021*).

#### 1.5 GENES ASSOCIADOS À ELA

Atualmente, com o avanço das pesquisas genômicas, diversos genes causadores de ELA foram identificados, como por exemplo, *C9orf72*, *CHCHD10*, *SQSTM1*, *TBK1*, *CCNF*, *FUS*, *TARDBP*, *OPTN*, *UBQLN2*, *TUBA4A*, *ATAXN2*, *VCP* e *CHMP2B* (*MEAD R et al., 2023*) e têm contribuído significativamente para o diagnóstico molecular da ELA, permitindo a identificação

de variantes genéticas associadas a formas familiares e esporádicas da doença. Isso não só facilita a confirmação diagnóstica, mas também abre caminhos para tratamentos personalizados, considerando as características genéticas de cada paciente (SILVEIRA Et al., 2024). No entanto, a ELA é uma doença incurável, e os tratamentos disponíveis são apenas paliativos, focados em aliviar os sintomas e melhorar a qualidade de vida dos pacientes (MSD MANUALS, 2021).

## 1.6 UBQLN2

Um dos diversos genes identificados como responsáveis pela disrupção da rede neural é o *UBQLN2* (MEAD Et al., 2023). Também conhecido como Chap1, Dsk2 ou PLIC, este gene está localizado no cromossomo Xp11.21 (RENAUD Et al., 2019). Além disso, a proteína codificada pelo *UBQLN2* contém 12 repetições do domínio PXX, que desempenham um papel crucial nas interações entre proteínas; esse domínio faz com que se diferencie o *UBQLN2* dos outros membros da família ubiquilina (RENAUD Et al., 2019).

O *UBQLN2* codifica a Ubiquilina-2, uma proteína essencial para a degradação de proteínas redundantes e mal dobradas, atuando através do sistema ubiquitina-proteassoma e da macroautofagia. Assim, a Ubiquilina-2 funciona como uma chaperona molecular crucial para a homeostase proteica (RENAUD Et al., 2019). Além do domínio PXX, o *UBQLN2* possui em sua porção N-terminal um domínio semelhante à ubiquitina (UBL), com cerca de 70 aminoácidos, que se liga ao proteossoma, e um domínio associado à ubiquitina na região C-terminal (UBA), que possui 40 aminoácidos, e é responsável por identificar as cadeias de poliubiquitina em proteínas marcadas para degradação (RENAUD et al., 2019).

O estudo pioneiro de Deng et al. (2011) foi importante na identificação das mutações no *UBQLN2* (P497H, P497S, P506T, P509S, P525S), como uma das causas raras da ELA, particularmente nas formas familiares da doença. Os autores analisaram que as mutações nesse gene estavam relacionadas ao acúmulo de agregados proteicos nas células neuronais, sugerindo que a falha na degradação de proteínas desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da ELA. Mutações no *UBQLN2*, na ELA, podem levar à deficiência de autofagia, resultando no acúmulo de proteínas tóxicas, como TDP-43, FUS, SOD1 e até mesmo a própria *UBQLN2* mutada (RENAUD et al., 2019). Esse acúmulo leva à formação de inclusões citoplasmáticas nos neurônios motores, comprometendo o transporte

axonal e contribuindo para a neurodegeneração (DENG et al., 2011) e progressão da doença.

### 1.7 JUSTIFICATIVA

A Esclerose Lateral Amiotrófica é uma doença neurodegenerativa de progressão muito rápida, levando à morte, com sobrevida média após o diagnóstico de 2 a 5 anos (GOUTMAN S et al., 2023). A identificação das variantes genéticas, como as do *UBQLN2*, pode contribuir para um diagnóstico mais preciso a partir da variante causal, permitindo abordagens clínicas mais adequadas. Além disso, essa identificação pode abrir possibilidades para o desenvolvimento de tratamentos e terapias mais específicas e assim, mudar esse quadro progressivo da doença (MEJZINI, RITA et al., 2019). Atualmente, ELA é uma doença sem cura e a maioria das terapias são terapias paliativas, então quanto mais informações genéticas mais específico será o tratamento e assim maior as chances de uma melhor qualidade de vida (LINDEN, 2010).

### 1.8 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo analisar a sequência codificadora do gene *UBQLN2* em pacientes com Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), utilizando o sequenciamento de Sanger e o sequenciamento completo do exoma na população do Rio de Janeiro. Para isso, foram identificadas as variantes presentes no gene, verificada a ocorrência dessas variantes em bancos de dados genéticos públicos e na literatura, avaliadas quanto à sua patogenicidade e possível relação com a doença, além de correlacionadas com os dados clínicos dos pacientes. Também foram detalhados e analisados os polimorfismos encontrados, considerando suas potenciais associações com a ELA.

## 2 METODOLOGIA

O diagnóstico dos 87 pacientes com ELA foi estabelecido após exames clínicos e neurofisiológicos realizados por neurologistas especializados do Instituto de Neurologia Deolindo Couto (INDC/UFRJ), seguindo os critérios definidos pelo El Escorial World Federation of Neurology (BROOKS et al, 2000). Todos os participantes, ou seus representantes legais, foram esclarecidos quanto às intenções da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Este trabalho segue as normas de pesquisa em seres humanos do CNS/Ministério da Saúde (resolução 466/2012), e foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FIOCRUZ (CAAE: 03830512.8.0000.5248).

### 2.1 COLETA E EXTRAÇÃO

A coleta de 5 mL de sangue de cada paciente, com posterior extração do DNA, foi realizada após a assinatura do TCLE. O DNA genômico foi extraído de leucócitos sanguíneos periféricos usando o kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen, Carlsbad, CA), conforme as especificações do fabricante. Para determinar a concentração de DNA nas amostras, foi utilizado o fluorômetro Invitrogen Qubit® 4 da Thermofisher (Waltham, MA, USA). Para avaliar a pureza do DNA, utilizou-se um espectrofotômetro NanoDrop® 2000 disponível na Plataforma RPT01J do IOC/FIOCRUZ. Para o sequenciamento completo do exoma, as amostras deveriam apresentar valores mínimos de qualidade de >1,8 para a razão 260/280 e entre 1,8 e 2,2 para a razão 260/230. As amostras de DNA permanecem armazenadas a -20°C no biorrepositório do Laboratório de Genética Humana (LGH) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) – FIOCRUZ (RJ).

### 2.2 ANÁLISE MOLECULAR

O gene *UBQLN2* foi analisado através de sequenciamento de Sanger e sequenciamento completo de exomas.

#### 2.2.1 DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS

A sequência do gene *UBQLN2* foi obtida através do banco internacional de sequências Ensembl (disponível em <http://www.ensembl.org/index.html>), tendo sido selecionado o transcrito ENST00000338222.7 como referência. Os

oligonucleotídeos foram desenhados com o auxílio do programa Primer3Web, ([http://primer3plus.com/web\\_3.0.0/primer3web\\_input.htm](http://primer3plus.com/web_3.0.0/primer3web_input.htm)) e em seguida os mesmos foram avaliados através de ferramentas de bioinformática disponíveis no site PrimerStats (em [http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr\\_primer\\_stats.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html)) para verificar adequação aos parâmetros necessários para a realização da PCR. Como o gene *UBQLN2* apresenta apenas um único longo éxon, foi necessário dividi-lo em cinco regiões (1.1, 1.2, 1.3, 1.4 e 1.5) para gerar reações de alto rendimento. Desta forma, foram desenhados cinco pares de oligonucleotídeos (Tabela 1) para cobrir toda a região codificadora do gene e adjacências.

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos desenhados para o gene *UBQLN2*, utilizadas para amplificação e análise das regiões de interesse sequências dos oligonucleotídeos desenhados para o gene *UBQLN2*.

Gene	Nome do Primer	Sequência do Oligonucleotídeo	Amplicon (pb)
<i>UBQLN2</i>	Primer Exon1.1F_UBQLN2	5'-TGCCTCCTTCCTTCCTCCTT-3'	587
	Primer Exon1.1R_UBQLN2	5'-CTGGAGCTCAGAGAAGTTGGT-3'	
	Primer Exon1.2F_UBQLN2	5'-TCCACAAATAGCAACCCGTT-3'	602
	Primer Exon1.2R_UBQLN2	5'-CTTGTGGTCGTGCTGGTAGT-3'	
	Primer Exon1.3F_UBQLN2	5'-AGTTCCTCCTCTGGGGAAGG-3'	492
	Primer Exon1.3R_UBQLN2	5'-CCCCTGCTGGATCTGCATTA-3'	
	Primer Exon1.4F_UBQLN2	5'-GCAAATCCTCAGCTGCAGGA-3'	507
	Primer Exon1.4R_UBQLN2	5'-CAGTTGTGCTGAAATCTGACT-3'	
	Primer Exon1.5F_UBQLN2	5'-CCCTGTAGGCCAGTCACC-3'	495
	Primer Exon1.5R_UBQLN2	5'-AGTAAAGAACGATTTTGTGTGTGT-3'	

Fonte: Elaborada pelo autor

## 2.2.2 PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE) E PURIFICAÇÃO

De início, realizamos uma PCR de gradiente para definirmos a melhor temperatura de hibridização dos pares de oligonucleotídeos. As enzimas Taq DNA Polimerase utilizadas para cada uma das reações de PCR estão dispostas na tabela 2, assim como a temperatura de hibridização dos oligonucleotídeos e o número de ciclos da PCR. Os reagentes utilizados para cada tipo de Taq DNA Polimerase, bem como suas concentrações, são mostrados na Tabela 3.

Tabela 2. Condições utilizadas para a amplificação das regiões/exões do gene *UBQLN2* por PCR.

Gene	Região/ éxon	Taq DNA Polimerase	Temperatura de hibridização	Número de ciclos
<i>UBQLN2</i>	1.1	ND	ND	ND
	1.2	Cellco recombinant ®	66°C	35
	1.3	Taq platinum ®	60°C	35
	1.4	Taq platinum ®	58,5°C	35
	1.5	Cellco recombinant ®	68°C	35

Tabela 2. ND: não determinado. Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 3. Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na reação de PCR convencional para amplificação do gene *UBQLN2*

	Cellco recombinant ®	Taq platinum ®
Reagentes	Volume 1X	Volume 1X
MilliQ	16,8 µL	15,8 µL
Tampão 10X	2,5 µL *	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub> 50mM	0 µL	1,0 µL
DNTP 2mM	2,5 µL	2,5 µL
Primer Forward 10 µM	1,0 µL	1,0 µL
Primer Reverso 10 µM	1,0 µL	1,0 µL
Enzima 5U/µL	0,2 µL	0,2 µL
Total	24 µL	24 µL
DNA	1 µL	1 µL
Volume final	25 µL	25 µL

\*Tampão contém MgCl<sub>2</sub>.

Fonte: Elaborada pelo autor

A ciclagem foi realizada no termociclador Veriti modelo 9902 (Thermo Fisher Scientific). As ciclagens relativas a cada Taq DNA Polimerase estão disponíveis na Tabela 4.

Tabela 4. Ciclagens utilizadas para padronização da PCR.

Cellco recombinant ®			Taq platinum ®		
°C	Tempo	Nº de ciclos	°C	Tempo	Nº de ciclos
95	3 min	1	94	2 min	1
95	30 seg		94	30 seg	
~	30 seg	35-38	~	30 seg	35
72	1 min		72	30 seg	
72	2 min	1	4	∞	1

Fonte: Elaborada pelo autor

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (Thermo Fisher Scientific), diluída em tampão TAE 1X (LGC Biotecnologia). As amostras foram preparadas adicionando-se 4 µL da alíquota da reação de PCR a 2 µL de corante de corrida (azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol 0,25%; glicerol 30%) e 1 µL de GelRed <sup>TM</sup> (Uniscience) diluído previamente em 500 µL de água destilada. A eletroforese foi realizada a 98 V, durante 40 minutos em cuba horizontal

(LCH –12x14 / Locus Biotecnologia). A amplificação do DNA foi observada através da comparação de sua intensidade com a de um marcador de tamanho molecular de 100 pb (Invitrogen). O gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (L.PIX – Locus Biotecnologia) e o registro fotográfico arquivado. Em todas as reações foi utilizado um controle negativo para assegurar que os reagentes utilizados na reação não apresentassem contaminação com DNA exógeno. Após a padronização da reação de PCR, todos os produtos foram purificados a partir do kit ExoSAP-IT® Reagent (Applied Biosystems, Vilnius, Lithuania). Foram utilizados 2,5 µL do material amplificado e 1 µL da enzima ExoSAP-IT. Em seguida, as reações foram incubadas a 37°C por 15 min para tratamento com a enzima e a inativação da mesma por 15 min a 80°C.

### 2.2.3 SEQUENCIAMENTO DE SANGER

Após a purificação, as regiões codificadoras do gene *UBQLN2*, bem como suas regiões adjacentes, foram analisadas através de sequenciamento automático de Sanger na Plataforma Tecnológica de Sequenciamento de DNA do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz (RPT01A). As reações de sequenciamento dos produtos purificados da PCR foram preparadas em uma placa de 96 poços [MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific)], em um volume final de 5µL, utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific), contendo: 50 ng do DNA purificado; 3,2 pmol do oligonucleotídeo senso ou antisenso; 1,0 µL de tampão (Thermo Fisher Scientific), 0,5 µL do BigDye (Thermo Fisher Scientific) e água milliQ para um volume final de 5,0 µL de reação. As reações foram conduzidas no termociclador Veriti modelo 9902 (Thermo Fisher Scientific). A ciclagem da reação consistiu em 35 ciclos de desnaturação a 96° C por 15 segundos, hibridização a 50° C por 10 segundos e extensão a 60° C por 4 minutos.

### 2.2.4 SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO EXOMA

Em parceria com Laboratório de Alta Complexidade do Instituto Fernandes Figueira (LACIFF - FIOCRUZ), o preparo das bibliotecas de DNA foi realizado com o kit Illumina DNA Prep with Enrichment de acordo com as instruções do fabricante (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). Durante a preparação da biblioteca, os fragmentos de DNA foram avaliados usando o Sistema Agilent 2100 Bioanalyzer. Para a etapa de sequenciamento, foi utilizado o sequenciador Illumina NovaSeq X



(Illumina, Inc., San Diego, CA, USA), localizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

### 2.3.1 ANÁLISE DAS MUTAÇÕES

As variantes encontradas neste estudo foram rastreadas nos bancos de dados GenomAD, AbraOM, ClinVar, ExAC, assim como em publicações prévias, com o intuito de avaliar se já foram descritas e se há estudos sobre sua patogenicidade. Além disso, foi realizada a avaliação quanto à sua patogenicidade através de análises *in silico* nos programas SIFT, Polyphen, Mutation Taster e VarSome.

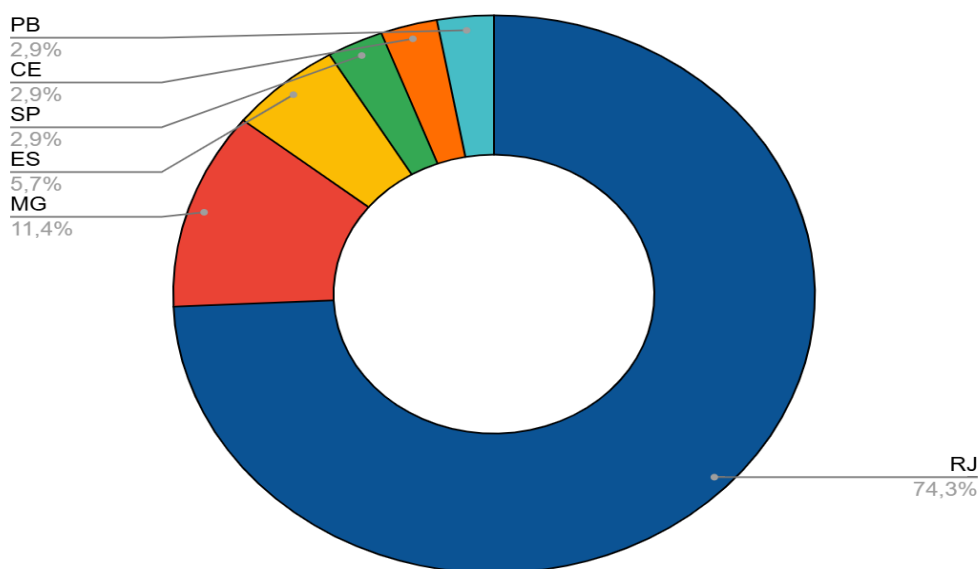
Os resultados obtidos no exoma, carregados na plataforma Franklin, foram filtrados de acordo com a possível associação com a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), a classificação de patogenicidade, baixa frequência (o filtro de baixa frequência é utilizado para destacar variantes genéticas raras com maior potencial de serem causadoras da doença, enquanto variantes de alta frequência geralmente são consideradas benignas ou polimórficas). Além disso, foi usado o filtro “Closest Exon Distance” (distância até o éxon mais próximo), que mostra o quão perto a variante está de um éxon. Variantes dentro ou muito próximas a éxons podem influenciar o splicing ou a própria proteína, enquanto as mais distantes costumam ter menor importância clínica. Todas as variantes, inclusive aquelas classificadas como benignas, serão avaliadas de forma a confirmar sua classificação por meio da análise das frequências populacionais disponíveis no VarSome e em outros bancos de dados de referência.

No caso de ser identificada a variante de *UBQLN2* como potencial causa da doença, será realizada a comparação entre o genótipo e o fenótipo clínico do paciente. Além disso, por meio da plataforma Uniprot, serão consultadas publicações científicas e analisadas variantes próximas à encontrada, a fim de ampliar a interpretação do resultado.

### 3 RESULTADOS

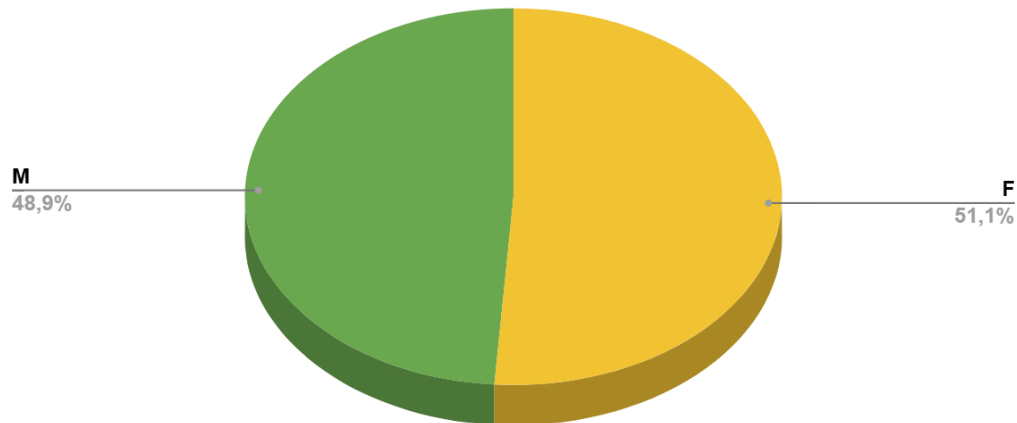
Dos 87 pacientes analisados, foram coletadas informações demográficas e clínicas com o objetivo de caracterizar o perfil da amostra estudada. O local de nascimento se concentrou na região sudeste do Brasil (Figura 1), sendo a maioria originária do Rio de Janeiro (74,3%), seguida por Minas Gerais (11,4%), Espírito Santo (5,7%) e São Paulo (2,9%). Em relação ao sexo (Figura 2), 48,9% dos pacientes eram do sexo masculino e 51,1% do sexo feminino. A classificação dos casos (Figura 3) mostrou que 77,8% dos indivíduos apresentaram ELA esporádica, enquanto 22,2% foram casos familiares. No aspecto clínico, os pacientes apresentaram uma variedade de sintomas iniciais, incluindo fraqueza muscular, câimbras, atrofia, principalmente nos membros superiores e inferiores, além de alterações na fala e dificuldade para deglutir. Outros relatos foram dificuldades de locomoção, perda de equilíbrio, tremores, fadiga e alterações respiratórias. A idade de início dos sintomas dos pacientes variou entre 26 e 79 anos, com média de 53 anos.

Figura 1- Distribuição percentual dos pacientes de acordo com o estado de nascimento dos pacientes.



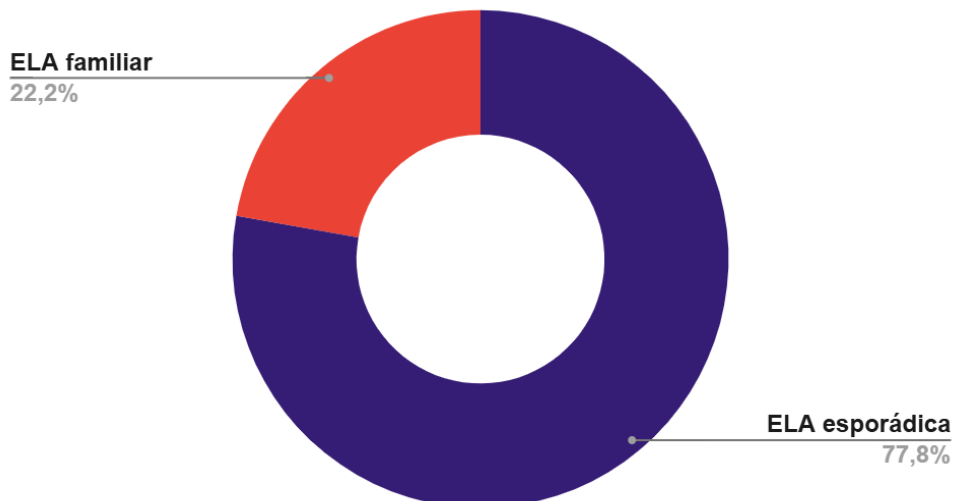
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figurar 2 –Distribuição percentual dos pacientes segundo o sexo, sendo representados em amarelo os pacientes do sexo masculino e em verde os pacientes do sexo feminino.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3 – Distribuição percentual dos pacientes com ELA, de acordo com a forma de apresentação da doença, mostrando a proporção de casos familiares e esporádicos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Neste estudo, todos os 87 pacientes foram avaliados quanto à presença de alterações genéticas no gene *UBQLN2*, incluindo mutações e polimorfismos. Entre eles, 44 pacientes foram submetidos ao sequenciamento de exoma completo, mas

apenas o *UBQLN2* foi analisado neste trabalho. Os outros 43 pacientes tiveram o gene *UBQLN2* analisado previamente por sequenciamento de Sanger.

Para o paciente ALS127, uma mulher diagnosticada aos 42 anos de idade, foi encontrado apenas um polimorfismo no gene *UBQLN2* (Tabela 5). Por ser uma variante sinônima, não altera o aminoácido da proteína. Além disso, apresenta frequência elevada na população, sendo, portanto, caracterizada como um polimorfismo e não como uma mutação causal.

Somente em um paciente (ALS84), uma mulher diagnosticada aos 26 anos, foi identificada uma variante de significado incerto, possivelmente causal, no gene *UBQLN2*, correspondente à mutação p.Gly479Val, sem registro prévio em banco de dados (Tabela 5). Para uma análise mais aprofundada, foi analisado o exoma do paciente. Além da alteração no gene *UBQLN2*, também foram observadas variantes patogênicas, provavelmente patogênicas, ou de significado incerto, em outros 36 genes, quatro deles previamente associados à ELA (Tabela 6). Em relação a estes quatro genes, as variantes identificadas foram: três classificadas como falha técnica (genes *RNF13*, *MTTP* e *SPTLC1*) e uma variante no gene *ERBB4*, considerada como de significado incerto pelos preditores.

Tabela 5 – Variantes identificadas no gene *UBQLN2* nos pacientes analisados, incluindo ID do paciente, alteração proteica, troca de bases e éxon correspondente

ID do paciente	Variante	Troca de bases	Éxon
ALS 84/14	p.Gly479Val	c.1436G>T	1
ALS127/16	p.Thr487=	c.1461C>A	1

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 6 – Variantes de significado incerto em genes relacionados à ELA para a paciente ALS 84, apresentando informações sobre a sequência alterada e o éxon afetado

Gene	Variante	Éxon
<b><i>ERBB4</i></b>	c.884-6A>C	8
<b><i>SPTLC1</i></b>	c.306C>G	4
<b><i>RNF13</i></b>	c.322-11_322-10del	5
<b><i>MTTP</i></b>	c.30C>G	1

Fonte: Elaborado pelo autor.

Muitos casos foram relatados como falha pelo Franklin, e o VarSome também demonstrava essa classificação, não apresentando nenhum registro em dados da literatura. As variantes nos genes *RFN13*, *SPTLC1* e *MTTP* apareceram em todos os pacientes, o que reforça a interpretação de que se tratam de falhas técnicas e não de mutações verdadeiras.

A variante c.884-6A>C, no gene *ERBB4*, foi considerada benigna pelo Varsome. Por estar em uma região de íntron, e os preditores convencionais a considerarem como uma variante benigna ou de significado incerto, foi utilizado um preditor específico de splicing (SPLICEAI) para a análise de patogenicidade; a variante não foi considerada patogênica.

A análise genética foi complementada com a avaliação das variantes classificadas como benignas para a paciente ALS84. A partir de um painel de 122 genes, selecionados com base na sua relevância em relação à ELA, foi observado que ocorreram 15 variantes benignas em 12 genes. A natureza benigna das variantes foi confirmada também pela verificação de suas frequências e foram submetidas ao Varsome para comparação dos preditores *in silico* (Tabela 7).

Tabela 7 – Análise das variantes benignas da paciente ALS 84 , com gene, alteração genética e classificação dos preditores *in silico*.

GENE	VARIANTE	ANÁLISE DOS PREDITORES <i>IN SILICO</i>
<i>DPP6</i>	c.2378-8_2378-7del	Benigno
<i>SETX</i>	p.Gly2036=	BP4:Fortemente Benigno
<i>SETX</i>	p.Lys1190Glu	BP4:Fortemente Benigno
<i>ATXN3</i>	p.Gln298Alafs*20	Benigno
<i>FUS</i>	c.1542-5del	Benign
<i>ALS2</i>	c.280A>G	BP4:Fortementem Benigno
<i>ALS2</i>	p.Glu159Lys	Benigno
<i>VWA8</i>	p.Glu1300Lys	BP4:Fortementem Benigno
<i>VWA8</i>	p.Arg660Gly	Benigno
<i>SLC6A4</i>	p.Thr439=	Benigno
<i>TXNRD1</i>	c.990-8del	Benigno
<i>SLC12A2</i>	p.Ala107del	Benigno
<i>SIRT1</i>	p.Gly66Cys	Benigno
<i>TNFRSF10B</i>	p.Thr197Met	Benigno
<i>GFM1</i>	c.1910-8del	Benigno

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a confirmação das variantes benignas, todas as variantes que não apresentavam relação com a doença foram descartadas.

Para dar suporte à variante p.Gly479Val como causa da ELA na paciente ALS84, foi realizada a correlação genótipo-fenótipo, relacionando a variante com as características clínicas observadas na paciente. Na análise feita através do programa Uniprot, foram identificadas mutações (a partir de dados da literatura) em regiões próximas à variante p.Gly479Val: Thr487Ile e Pro497His/Ser. Estas duas mutações são associadas à presença de inclusões de ubiquilin-2 nos neurônios motores, início precoce da ELA e, em alguns casos, formas mais agressivas da doença. Na paciente do nosso estudo, a ELA era do tipo familiar, com a doença se apresentando de forma mais agressiva, início dos sintomas aos 26 anos de idade, tetraparesia espástica, comprometimento bulbar e progressão motora significativa.

Em relação aos demais pacientes, não foram observadas variantes em *UBQLN2*.

## 4 DISCUSSÃO

O diagnóstico da ELA é frequentemente tardio, levando em média cerca de um ano e meio até sua confirmação clínica, período em que a doença geralmente já se encontra em estágio avançado. Considerando que a sobrevida média após o início dos sintomas varia de 2 a 5 anos (GOUTMAN et al., 2023; FELDMAN et al., 2022), torna-se evidente a importância de abordagens que favoreçam a detecção precoce. Nesse contexto, as análises genéticas surgem como ferramentas essenciais, contribuindo não apenas para o aprimoramento do diagnóstico, mas também para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas específicas (MEJZINI et al., 2019).

Neste estudo, 87 pacientes com ELA foram avaliados quanto a dados demográficos, clínicos e genéticos. A maioria dos participantes era do estado do Rio de Janeiro, refletindo o local de recrutamento da amostra. Quanto ao sexo, a distribuição foi equilibrada: 48,9% homens e 51,1% mulheres, sem diferença significativa entre os grupos, o que vai de acordo com a literatura que aponta incidência semelhante entre os sexos (AGNELLO; CIACCIO, 2022). Em relação à classificação clínica, observou-se predominância de casos esporádicos (77,8%) em comparação com os familiares (22,2%), reforçando estimativas de ELA esporádica ser a maioria dos casos (SEVER, 2022).

Os sintomas iniciais foram bastante variados, incluindo fraqueza muscular, câimbras, atrofia em membros superiores e inferiores, alterações na fala e na deglutição. Outros sinais, como dificuldades de locomoção, tremores, fadiga e alterações respiratórias, também foram relatados, evidenciando a diversidade fenotípica da doença. Essa variabilidade clínica é compatível com o que se conhece sobre a ELA, uma doença que acomete diferentes grupos musculares, resultando em manifestações distintas entre os pacientes (FELDMAN et al., 2022; MEAD et al., 2023).

Do ponto de vista molecular, entre os 44 pacientes submetidos ao sequenciamento completo de exoma, apenas um (ALS84; uma mulher de 26 anos no momento do aparecimento dos primeiros sintomas) apresentou uma mutação

no gene *UBQLN2*, a p.Gly479Val, ainda não registrada em bancos de dados, indicando uma variante rara e possivelmente inédita em ELA familiar. Essa baixa frequência de mutações nesse gene é consistente com a literatura, que descreve alterações em *UBQLN2* como eventos raros tanto em ELA familiar quanto esporádica (MILLECAMPS et al., 2012). Além disso, variantes em outros quatro genes foram identificadas na paciente ALS84, sendo três classificadas como falha técnica (genes *RFN13*, *MTTP* e *SPTLC1*), enquanto a variante em *ERBB4* foi considerada benigna pelos preditores. Esses achados reforçam a necessidade de confirmar todas as variantes identificadas para validar sua relevância clínica e assim descobrir a mutação causal (RENAUD et al., 2019). A descoberta da mutação rara em *UBQLN2*, que se relaciona com sinais clínicos típicos de ELA familiar, também destaca como o sequenciamento genético pode ajudar a entender a diversidade molecular da doença e apoiar o acompanhamento dos pacientes, além de abrir caminho para possíveis estratégias terapêuticas (MATTHEWS et al., 2025). Os outros 43 pacientes que foram analisados por Sanger não apresentaram mutações em *UBQLN2*.

Também foram observadas variantes benignas, que, embora não estejam diretamente associadas à ELA, foram analisadas e confirmadas por meio de bancos populacionais e do VarSome garantindo que nenhuma variante fosse descartada sem verificação. Entre elas, identificou-se apenas um polimorfismo, ALS 127, no gene *UBQLN2* (c.1461C>A, p.Thr487=). Por se tratar de uma mutação sinônima, que não altera a sequência de aminoácidos da proteína, foi classificada como provavelmente benigna. No entanto, mesmo variantes sinônimas podem influenciar a estabilidade do RNA mensageiro, a eficiência da tradução ou a regulação de *splicing*, impactando indiretamente a função da proteína. A análise desses polimorfismos é relevante para caracterizar o perfil genético da população estudada e reforçar a distinção entre variantes patogênicas e benignas (SUBRAMANIAN et al., 2025).

A avaliação detalhada da paciente ALS84 foi fundamental para correlacionar genótipo e fenótipo. Clinicamente, a paciente apresentou início precoce da doença, com comprometimento bulbar, tremores e tetraparesia espástica, evoluindo para atrofia distal nos membros superiores e hipertrofia nos membros inferiores. Variantes em regiões próximas à p.Gly479Val (identificada na paciente do nosso



estudo), como Thr487Ile (WILLIAMS et al., 2012) e Pro497His/Ser (DENG et al., 2011; XIA et al., 2014; GILPIN et al., 2015), têm sido associadas à presença de inclusões de ubiquilina-2 nos neurônios motores, início precoce da ELA e, em alguns casos, formas mais agressivas da doença. Com base nessas evidências, a mutação p.Gly479Val parece estar relacionada ao fenótipo da paciente, caracterizado por início precoce, tetraparesia espástica, comprometimento bulbar e progressão motora significativa.

Estudos indicam que variantes patogênicas nessa região do gene *UBQLN2* estão associadas ao acúmulo de ubiquilina-2 nos neurônios motores da medula espinhal, frequentemente associadas a ubiquitina, TDP-43 e FUS, proteínas fortemente relacionadas à patogênese da ELA (NEUMANN et al., 2006; RENAUD et al., 2019). Esses acumulados ajudam a explicar a disfunção proteica observada em ELA e mostram como a variante genética pode estar ligada ao quadro clínico da paciente. Ademais, o fato de a mutação Thr487Ile estar próxima de outras variantes associadas a formas mais agressivas da doença, como as localizadas em Pro497, sugere que alterações nesse domínio da proteína podem contribuir para uma evolução mais rápida e grave da ELA (LIN et al., 2021).

Alguns dos desafios encontrados durante a realização deste trabalho incluíram a escassez de dados clínicos, uma vez que muitos prontuários estavam incompletos. Além disso, parte das amostras utilizadas era bastante antiga, o que comprometeu a integridade do material e dificultou nas repetições dos processos de extração de DNA.

## 5 CONCLUSÃO

A análise do gene UBQLN2 em pacientes com Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) da população do Rio de Janeiro permitiu identificar uma variante rara e inédita (p.Gly479Val) em uma paciente com ELA familiar, sugerindo uma possível relação entre a mutação e o quadro clínico apresentado. A baixa frequência de mutações no UBQLN2 observada neste estudo está de acordo com a literatura, que descreve alterações nesse gene como eventos raros na ELA. A amostra apresentou predominância de casos esporádicos, equilíbrio entre os sexos e média de idade de início dos sintomas de 53 anos, refletindo a diversidade dos pacientes analisados.

Dessa forma, os objetivos do estudo foram alcançados, uma vez que foi possível identificar, caracterizar e correlacionar geneticamente as variantes encontradas com os dados clínicos, diferenciando as causais das benignas com o auxílio de ferramentas de bioinformática e bancos de dados populacionais.

Este trabalho contribui para o entendimento genético da ELA no Brasil, reforçando a importância da análise genético-molecular como ferramenta essencial para o diagnóstico precoce, o aconselhamento genético e, futuramente, para a indicação de terapias específicas. Como perspectiva futura, destaca-se a necessidade de investir no desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas a variantes específicas, uma vez que a identificação de mutações como a p.Gly479Val pode abrir caminho para tratamentos personalizados, incluindo terapias gênicas voltadas aos mecanismos patogênicos associados à doença.

## 6 REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA – ABrELA. Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). São Paulo: ABrELA, 2018. Disponível em:

[https://www.abrela.org.br/wpcontent/uploads/2018/05/AbrELA\\_LIVRETO\\_web.pdf](https://www.abrela.org.br/wpcontent/uploads/2018/05/AbrELA_LIVRETO_web.pdf).

BROOKS, B. R.; MILLER, R. G.; SWASH, M.; MUNSAT, T. L.; WORLD FEDERATION OF NEUROLOGY RESEARCH GROUP ON MOTOR NEURON DISEASES. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders*, v. 1, n. 5, p. 293–299, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11464847/>.

DENG, H. X.; CHEN, W.; HONG, S. T.; BOYCOTT, K. M.; GORRIE, G. H.; SIDDIQUE, N.; YANG, Y.; FECTO, F.; SHI, Y.; ZHAI, H.; JIANG, H.; HIRANO, M.; RAMPERSAUD, E.; JANSEN, G. H.; DONKERVORT, S.; BIGIO, E. H.; BROOKS, B. R.; AJROUD, K.; SUFIT, R. L.; ... SIDDIQUE, T. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature*, v. 477, p. 211–215, 2011.

ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA) E OUTRAS DOENÇAS DO NEURÔNIO MOTOR (DNMS) - DISTÚRBIOS CEREBRAIS, DA MEDULA ESPINAL E DOS NERVOS - MANUAL MSD VERSÃO SAÚDE PARA A FAMÍLIA. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt/casa/dist%C3%BArbios-cerebrais-da-medula-espinhal-e-dos-nervos/nervo-perif%C3%A9rico-e-dist%C3%BArbios-relacionados/esclerose-lateral-amiotr%C3%B3fica-ela-e-outras-doen%C3%A7as-do-neur%C3%B4nio-motor-dnms>. Acesso em: 23 out. 2025.

FELDMAN, E. L.; GOUTMAN, S. A.; PETRI, S.; MAZZINI, L.; SAVELIEFF, M. G.; SHAW, P. J.; SOBUE, G. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, v. 400, p. 1363–1380, 2022.

GALBIATI, M.; CRIPPA, V.; RUSMINI, P.; CRISTOFANI, R.; MESSI, E.; PICCOLELLA, M.; TEDESCO, B.; FERRARI, V.; CASAROTTO, E.; CHIERICHETTI, M.; POLETTI, A. Multiple roles of transforming growth factor beta in amyotrophic lateral sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, p. 1–17, 2020.

GODOY, R. M.; GODOY, M. M.; GODOY, M. F. Exames complementares no diagnóstico das doenças neuromusculares. *Revista Brasileira de Medicina*, v. 48, n. 10, p. 1–8, 1991.

GOUTMAN, S. A.; SAVELIEFF, M. G.; JANG, D. G.; HUR, J.; FELDMAN, E. L. The amyotrophic lateral sclerosis exposome: recent advances and future directions. *Nature Reviews Neurology*, v. 19, p. 617–634, 2023.

JANSEN, G. H.; DONKERVORT, S.; BIGIO, E. H.; BROOKS, B. R.; AJROUD, K.; SUFIT, R. L.; ... SIDDIQUE, T. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature*, v. 477, p. 211–215, 2011.

KIM, S. H.; NICHOLS, K. D.; ANDERSON, E. N.; LIU, Y.; RAMESH, N.; JIA, W.; KUERBIS, C. J.; SCALF, M.; SMITH, L. M.; PANDEY, U. B.; TIBBETTS, R. S. Axon guidance genes modulate neurotoxicity of ALS-associated UBQLN2. *ELife*, v. 12, 2023.

LARA, N. Doenças raras: panorama dos gastos com internações nos planos de saúde do Brasil (2021 e 2022). Texto para Discussão nº 101. São Paulo: Instituto de Estudos de Saúde Suplementar – IESS, 2024. Disponível em: <https://www.iess.org.br/sites/default/files/2024-02/TD%20-%20101%20Doen%C3%A7as%20Raras.pdf>.

LIN, B. C.; PHUNG, T. H.; HIGGINS, N. R.; GREENSLADE, J. E.; PRADO, M. A.; FINLEY, D.; KARBOWSKI, M.; POLSTER, B. M.; MONTEIRO, M. J. ALS/FTD mutations in UBQLN2 are linked to mitochondrial dysfunction through loss-of-function in mitochondrial protein import. *Human Molecular Genetics*, v. 30, p. 1230–1246, 2021.

LINDEN, R. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. *Estudos Avançados*, v. 24, n. 69, p. 31–69, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ea/a/nmhVC8mrYSr9v68gRYRsPBS/>.

MASRORI, P.; VAN DAMME, P. Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. *European Journal of Neurology*, v. 27, n. 9, p. 1918–1929, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32526057/>.

MATTHEWS, A. M.; et al. UBQLN2 in neurodegenerative disease. *Science Direct*, 2025.

MEAD, R. J.; SHAN, N.; REISER, H. J.; MARSHALL, F.; SHAW, P. J. Amyotrophic lateral sclerosis: a neurodegenerative disorder poised for successful therapeutic translation. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 22, p. 185–212, 2023.

MEJZINI, R.; FLYNN, L. L.; PITOUT, I. L.; FLETCHER, S.; WILTON, S. D.; AKKARI, P. A. ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? *Frontiers in Neuroscience*, v. 13, 2019.

MENON, P.; VUCIC, S. The Upper Motor Neuron-Improved Knowledge from ALS and Related Clinical Disorders. *Brain Sciences*, v. 11, 2021.

MOUJALLED, D.; STRASSER, A.; LIDDELL, J. R. Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases. *Cell Death and Differentiation*, v. 28, p. 2029–2044, 2021.

NEUMANN, M.; SAMPATHU, D. M.; KWONG, L. K.; et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, v.

314, n. 5796, p. 130–133, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17023659/>.

RENAUD, L.; PICHER-MARTEL, V.; CODRON, P.; JULIEN, J. P. Key role of UBQLN2 in pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Acta Neuropathologica Communications*, v. 7, 2019.

SEVER, B.; TOZANI, F. de D.; SIQUEIRA, R. Esclerose lateral amiotrófica: aspectos clínicos e epidemiológicos. *Acervo Mais*, 2022. Disponível em: <https://acervomais.com.br/index.php/medico/article/view/12006>.

SILVEIRA, L. M. C. Esclerose lateral amiotrófica (ELA) e as estratégias terapêuticas: uma revisão, 2024. Disponível em: <https://repositorio.pucgoias.edu.br/jspui/bitstream/123456789/7812/1/Tcc-%20revista1.pdf>.

SUBRAMANIAN, S. K.; et al. Analysis of translational changes in the Ubqln2 P497S mouse model of ALS. *Frontiers in Neurology*, 2025.

TEYSSOU, E.; CHARTIER, L.; AMADOR, M. D. M.; LAM, R.; LAUTRETTE, G.; NICOL, M.; MACHAT, S.; DA BARROCA, S.; MOIGNEU, C.; MAIREY, M.; LARMONIER, T.; SAKER, S.; DUSSERT, C.; FORLANI, S.; FONTAINE, B.; SEILHEAN, D.; BOHL, D.; BOILLÉE, S.; MEININGER, V.; ... MILLECAMP, S. Novel UBQLN2 mutations linked to amyotrophic lateral sclerosis and atypical hereditary spastic paraplegia phenotype through defective HSP70-mediated proteolysis. *Neurobiology of Aging*, v. 58, p. 239.e11–239.e20, 2017.

TOZANI, F. de D.; SIQUEIRA, E. C. de. Esclerose Lateral Amiotrófica. *Revista Eletrônica Acervo Médico*, v. 23, n. 2, p. e12006, fev. 2023. Disponível em: <https://acervomais.com.br/index.php/medico/article/view/12006>.

WOLFSON, C.; GAUVIN, D. E.; ISHOLA, F.; OSKIOUI, M. Global prevalence and incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *Neurology*, v. 101, n. 6, p. e613–e623, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37308302/>.