

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

SUELLEN ROSSETO MENDONÇA

**Avaliação da expressão dos genes *DNAHC6*,
DYNLT1, *Pcdh21*, *SIGMAR1*, *Lingo1* e *Gabra2*
como marcadores moleculares na Doença de
Huntington**

VITÓRIA - ES

2018

Suellen Rosseto Mendonça

**Avaliação da expressão dos genes *DNAHC6*,
DYNLT1, *Pcdh21*, *SIGMAR1*, *Lingo1* e *Gabra2*
como marcadores moleculares na Doença de
Huntington**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia, na área de concentração em Bioquímica Clínica e Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dra. Daniela Amorim Melgaço Guimarães do Bem.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Rita Gomes Wanderley Pires.

VITÓRIA - ES

2018


Suellen Rosseto Mendonça

“Avaliação da expressão dos genes DNAHC6, Dynlt1, Pcdh21, Sigmar1, Lingo1 e Gabra2 como marcadores moleculares na Doença de Huntington”


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Aprovado(a) em 27 de setembro de 2018.

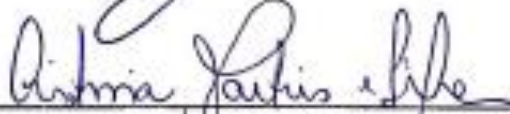
BANCA EXAMINADORA:



Prof.ª. Dr.ª. Daniela Amorim Melgaço Guimarães do Bem – Orientadora




Prof.ª. Dr.ª. Rita Gomes Wanderley Pires – Coorientadora



Prof.ª. Dr.ª. Cristina Martins e Silva – Examinador Interno



Prof. Dr. Marcelo Ramos Muniz – Examinador Externo



Prof.ª. Dr.ª. Flavia Imbroisi Valle Errera – Examinador Externo

Vitória/ES
2018

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Integrado de Bibliotecas da Ufes para ser confeccionada pelo autor

R829a Rosseto Mendonça, Suellen, 1986-
Avaliação da expressão dos genes DNAHC6, DYNLT1, Pcdh21, SIGMAR1, Lingol e Gabra2 como marcadores moleculares na Doença de Huntington / Suellen Rosseto Mendonça. - 2018.
70 f. : il.

Orientadora: Daniela Amorim Melgaço Guimarães do Bem.
Coorientadora: Rita Gomes Wanderley Pires.
Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Bioquímica molecular. 2. Diagnóstico molecular. 3. Genética molecular. I. Amorim Melgaço Guimarães do Bem, Daniela. II. Gomes Wanderley Pires, Rita. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

*Dedico esse trabalho aos pacientes
com a Doença de Huntington e familiares.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me atender e me dar força, paz e sabedoria para conduzir da melhor forma este estudo.

Às minhas orientadoras Dra. Daniela Amorim Melgaço Guimarães do Bem e Dra. Rita Gomes Wanderley Pires pela disponibilidade, aprendizagem, e por me encorajarem e acreditarem em mim sempre. Obrigada por confiar na minha capacidade para a conclusão deste trabalho.

À toda equipe do Ambulatório de Neurologia e Genética Médica do HUCAM-UFES, pela iniciativa do projeto Huntington que foi a base clínica fundamental para este estudo. Ao Dr. Marcelo Ramos Muniz pela confiança e por conduzir com muita competência este projeto. Ao Dr. Patrik Fontes, pela contribuição, disponibilidade e aprendizagem. À Dra. Maria do Carmo Souza Rodrigues pela contribuição. À Tatiana da Rocha Gomes pela disponibilidade e doçura na coleta dos pacientes.

À todos do Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental, pelo convívio e por cederem espaço para as minhas práticas, em especial à Tamara Alarcon (doutoranda) e a Isabella Olmo (doutoranda - UFMG) por estar sempre disposta a ajudar e compartilhar seus conhecimentos.

Ao Laboratório Hermes Pardini Ltda, em especial à Amanda Castro, pelo apoio.

A todos os meus colegas de mestrado e à aluna de Iniciação Científica Débora Maria do Carmo Rocha pela convivência e auxílio no trabalho.

Às queridas amigas Mayara Paes Santos (mestranda) e à MSc Lorraine Poltronieri Pereira pela amizade, inspiração e suporte sempre. Aos meus pais, namorado, amigos e familiares por compreender os momentos de ausência.

E por fim, aos pacientes com a Doença de Huntington e familiares com quem tive contato neste estudo, meu afeto e minha sincera gratidão, aos quais dedico este estudo.

Muito obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTB - β -actina

ACTBN – β -actina animal

Ach – Acetilcolina

BACHD – Camundongo transgênico modelo de DH mediado pelo cromossomo artificial bacteriano

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

CAG – Citosina-adenina-guanina

DH – Doença de Huntington

DNAHC6 – Dineína de cadeia pesada axonemal 6

DYNLT1 - Dineína de cadeia leve Tctex-tipo 1

ER – Retículo endoplasmático

GABA - Ácido gama amino butírico

Gabra2 - Receptor gama-aminobutírico A

Htt – Huntingtina

MAM – Membrana do retículo endoplasmático associada à mitocôndria

mGluR – Receptor metabotrópico de glutamato

mHtt – Huntingtina mutada

MSNs - Neurônios espinhosos médios

NMDAR - Receptor ácido N-metil-D-aspartico

Lingo1 - Domínio 1 do tipo imunoglobulina e repetição rico em leucina

Pcdh21 - Protocadherina-21

PCR- Reação em cadeia de polimerase

qPCR - PCR quantitativo em tempo real

RNFL – Camada de fibra nervosa da retina

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SIGMAR1 - Receptor intracelular sigma 1 não-opiídeo

SNC – Sistema nervoso central

UHDRS – Escala Unificada para avaliação da doença de Huntington

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alongamento patológico de poliglutamina causa neurodegeneração	12
Figura 2 - A análise histológica revela a expressão generalizada da proteína Htt nos tecidos humanos e nos tipos de células.....	14
Figura 3 - Mecanismo de ação da Htt nos neurônios	16
Figura 4 - Comparação de fenótipos entre modelos de camundongos de DH transgênicos e knock-in e pacientes humanos com DH.....	21
Figura 5 - Descrição do tempo dos eventos em modelos de camundongos de DH	22
Figura 6 - Suposto mecanismo <i>SIGMAR1</i> na MAM	27
Figura 7 - Complexos de sinalização <i>Lingo1</i>	28
Figura 8 - <i>Pcdh21</i> interage com filamentos de actina e outras proteínas causando distrofia macular.....	29
Figura 9 - Correlation of Age of 1st symptom in HD patients with CAG repeats in the major allele.	43
Figura 10 - Statistical evaluation of UHDRS.....	43
Figura 11 - Expression levels of genes <i>SIGMAR1</i> , <i>DYNLT1</i> , <i>DNAHC6</i> , <i>Lingo1</i> , <i>Pcdh21</i> e <i>Gabra2</i> in striatum of BACHD mice model of HD in early (4 months) and late stage of HD (12 months) quantified using qPCR	44 e 45
Figura 12 - Expression levels of genes <i>SIGMAR1</i> , <i>DYNLT1</i> and <i>DNAHC6</i> in the cellular blood of patients with HD quantified using qPCR.....	46
Figura 13 - Expression levels of gene <i>DYNLT1</i> in the cellular blood of patients with HD quantified using qPCR in different times and in the same patients	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferenças entre os modelos de DH	23
Tabela 2 - Sociodemographic characteristics of HD patients and control group... ..	36
Tabela 3 - Sequences of PCR primers for human samples	37
Tabela 4 - Sequences of PCR primers for mice samples	38
Tabela 5 - Relationship between the clinical staging of the HD patient by the UHDRS scale and the age group	42
Tabela 6 - Descriptive general analysis of the components of the UHDRS scale in HD patients.....	42

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2. OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3. RESUMO.....	31
4. INTRODUÇÃO	32
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
5.1 MODELO ANIMAL DE DH	34
5.2 PACIENTES	35
5.3 EXTRAÇÃO DE DNA DO SANGUE HUMANO	36
5.4 EXTRAÇÃO DE RNA DO SANGUE HUMANO.....	36
5.5 RT-PCR QUANTITATIVO	37
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
7. RESULTADOS	39
8. DISCUSSÃO	47
9. CONCLUSÃO.....	50
10. REFERÊNCIAS.....	51
APÊNDICE 1 – COMITÊ DE ÉTICA.....	60
APÊNDICE 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PACIENTES.....	61
APÊNDICE 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – CONTROLES.....	64
ANEXO 1 - ESCALA UNIFICADA PARA AVALIAÇÃO DA DOENÇA DE HUNTINGTON – UHDRS.....	67

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A doença de Huntington (DH) é uma desordem neurodegenerativa progressiva, hereditária autossômica dominante, que causa comprometimento emocional, cognitivo e motor, com atrofia do cérebro, particularmente na região do estriado, que inevitavelmente, leva a morte (ARONIN et al., 1995; DIFIGLIA et al., 1995; SHARP et al., 1995; RÜB et al., 2016a).

A DH foi referenciada pela primeira vez por Charles Oscar Waters, em 1842. Mas foi em 1972 que foi feita a primeira descrição mais aprofundada, por George Huntington (ROSS, 2010). Desde então, ficou conhecida como “Coréia de Huntington”, sendo o termo “coréia” derivada da palavra grega χορεία que significa dança, o que caracteriza as alterações motoras presente na doença (VIEREGGE, 2007). O termo foi substituído mais tarde por “Doença de Huntington” porque nem todos os pacientes desenvolvem a coréia, e devido à importância dos distúrbios cognitivos e comportamentais.

Causada por um alongamento na repetição expandida do trinucleotídeo CAG (3 bases de DNA: Citosina, Adenina e Guanina), responsável pela transcrição do aminoácido glutamina, localizado na região do braço curto do cromossoma 4p16.3, também chamado de IT15. Identificado apenas em 1993, o IT15 contém sequências meioticamente instáveis da repetição CAG em seu exon 1. Estas repetições instáveis de CAG no exon 1 de IT15 codifica a grande proteína huntingtina (Htt) de 350 KDa com 3100 aminoácidos, poliglutamínicos. Ao contrário de muitas outras proteínas de tamanho semelhante, a Htt é completamente solúvel (RÜB et al., 2016a; RÜB et al., 2016b; CATTANEO et al., 2005).

Alelos com repetições até 35 CAG não causam a DH, mas a faixa de 27 a 35 repetições de CAG podem expandir durante a meiose, e são chamados de alelos intermediários. Alelos com 36 a 39 repetições de CAG possuem penetrância reduzida. E alelos com mais de 40 repetições são sempre associados a DH. A idade de início, determinada pela primeira manifestação motora, está inversamente correlacionada com o comprimento da repetição CAG, enquanto que a penetrância da doença é diretamente correlacionada. Já

o fenótipo da DH pode significativamente variar de paciente para paciente com comprimento de repetições semelhantes (CASTILHOS et al., 2016; JIANG et al., 2015).

O alongamento patológico de poliglutamina (figura 1) resulta na proteína huntingtina mutante (mHtt), que é considerada responsável por esta proteína multifuncional perder a sua solubilidade normal em células nervosas e formar agregados protéicos, por ligações de hidrogênio entre si, em inclusões intra-neuronais nos diferentes compartimentos das regiões cerebrais, perturbando o funcionamento normal das células, por impedir o movimento das vesículas no citoesqueleto e interromper a ação de neurotransmissores, levando a morte celular. (RÜB et al., 2016a; JIANG et al., 2015; ORR, 2008).

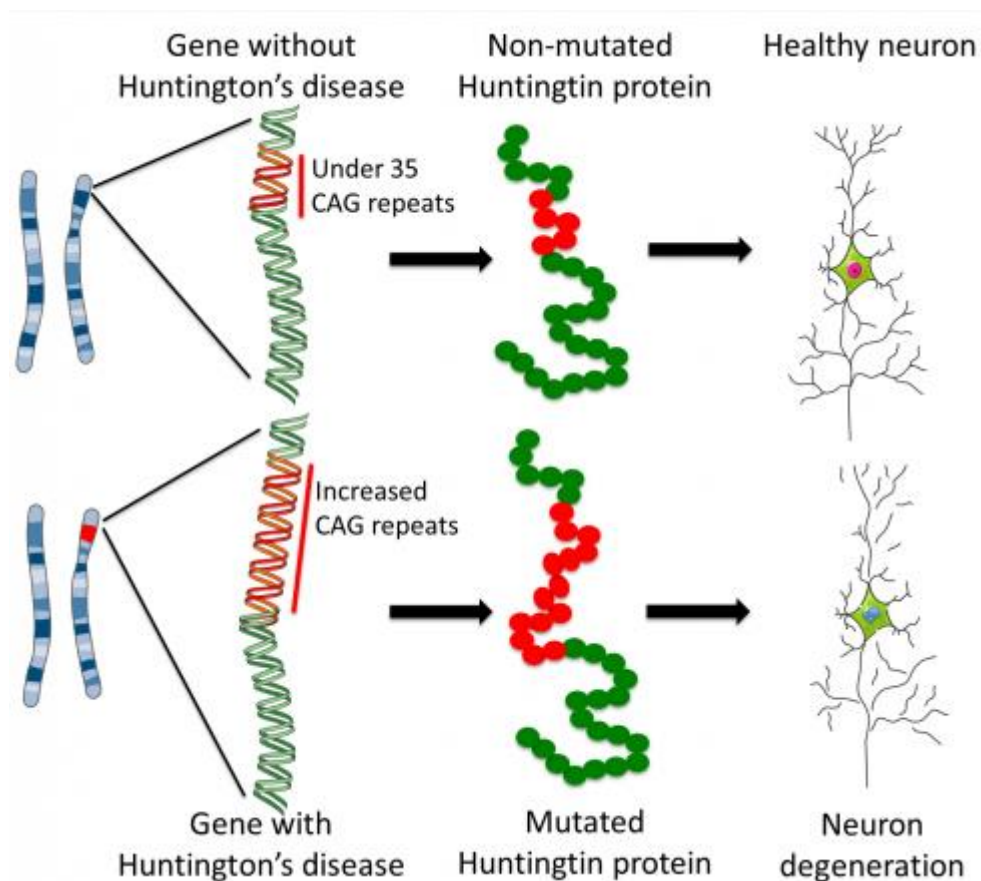


Figura 1 – Alongamento patológico de poliglutamina causa neurodegeneração.

Fonte: extraída de (<https://blog.cirm.ca.gov/2017/03/20/stem-cells-reveal-developmental-defects-in-huntingtons-disease/>, 2017).

Estudos sugerem que fragmentos N-terminais específicos da mHtt, antes da formação de agregados, podem prejudicar a função mitocondrial diretamente por alterações do tráfego intracelular baseado em microtúbulos. O que seria o primeiro fator importante para a degeneração neuronal, pois esta deficiência se reflete na disfunção da comunicação intercelular, antecedendo a sintomatologia clássica das doenças neurodegenerativas (MELO et al., 2013; ORR et al, 2008). Proteínas motoras especiais, ligadas aos microtúbulos, denominadas Dineínas, são proteínas chave do transporte axonal retrógrado. Sua alteração é de importante interesse, já que está relacionado à degeneração de neurônios motores. Resultados indicam que o transporte retrógrado com defeito é detectável antes da degeneração dos neurônios motores (VALLEE et al, 2004). E tem atraído cada vez mais atenção por parte dos pesquisadores por causa de seus papéis importantes e da sua associação com várias desordens neurológicas (CHEN et al., 2014).

A mHtt é expressa em todo o corpo (figura 2) desde o nascimento, mas a sua toxicidade celular não é limitada ao sistema nervoso, como se pensava inicialmente, e os sintomas só aparecem mais tarde na vida. As concentrações da mHtt são aumentadas de acordo com o estágio da doença em portadores da mutação e o gene causador é amplamente expresso fora do sistema nervoso central (SNC) com vários sinais periféricos da doença, como a perda de peso e o aumento da sinalização pro-inflamatória. No entanto, sua importância na fisiopatologia da DH não é clara. Portanto os tratamentos direcionados aos tecidos e órgãos fora do SNC podem ser alvo para melhorar a qualidade de vida dos pacientes com DH. (CARROLL et al., 2015).

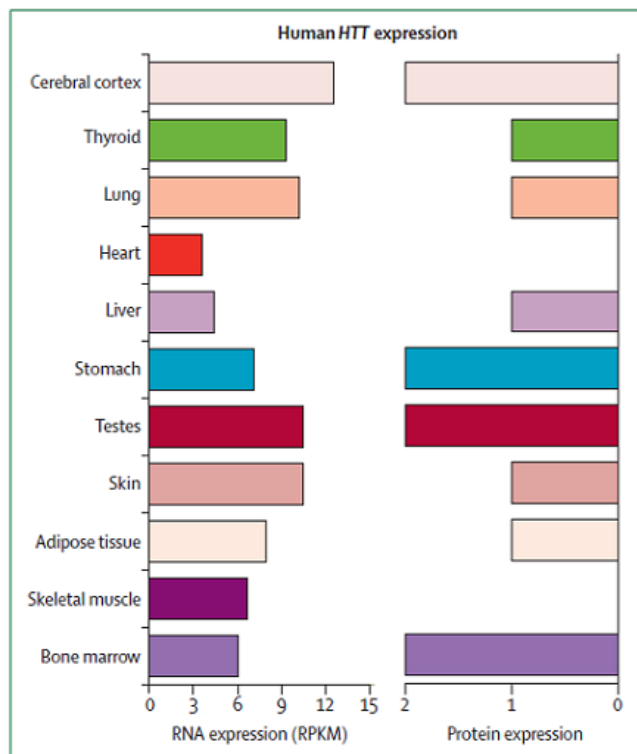


Figura 2 - A análise histológica (Hibridização in situ) revela a expressão generalizada da proteína Htt nos tecidos humanos e nos tipos de células. Para a expressão da proteína, 0 = não detectado, 1 = baixo e 2 = médio. RPKM = lê por kilobase por milhão.

Fonte: extraída de (CARROLL et al., 2015).

Tem sido sugerido que a perda de função da Htt normal, pode também contribuir para patogênese da DH. Intracelularmente, a huntingtina está associada com várias organelas, incluindo o núcleo, retículo endoplasmático e complexo de Golgi, e pode também ser encontrada nos axônios e nas sinapses, onde se associa com estruturas vesiculares, tais como vesículas revestidas por clatrina, compartimentos endossomais, e nos microtúbulos. Esta localização generalizada não facilita a definição da sua função. Embora se saiba que desempenha um papel importante no desenvolvimento embrionário, já que a sua ausência está relacionada com a morte embrionária, e também é anti-apoptótica, participa do controle da produção de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), que é particularmente importante para a

sobrevivência de neurônios do estriado, e facilita o transporte vesicular de BDNF ao longo dos microtúbulos (CATTANEO et al., 2005).

A proteína htt interage com uma vasta variedade de proteínas, e a mutação da Htt faz com que a sinalização celular se altere em vários sistemas de neurotransmissores, incluindo dopaminérgico, glutamatérgico, e sistemas canabinóides, bem como sistemas de fator trófico (RIBEIRO et al., 2011). Portanto as alterações cerebrais que envolvem a mHtt são bastante variadas e complexas.

Estudos mostram que há uma interação da Htt com algumas proteínas importantes para o mecanismo de endocitose, secreção de neurotransmissores, apoptose e expressão gênica. Nas células nervosas a Htt normal se complexa a proteína Hip-1, AP2 e clatrina, envolvidas na endocitose e secreção de neurotransmissores (CATTANEO et al., 2005). Na hipótese de Gervais e colaboradores (2002), a ligação de Hip-1, uma proteína normalmente associadas com Htt, é reduzida pela expansão da poliglutamina (figura 3). Livre, a Hip-1 liga-se a um polipeptídeo, Hipp1. A disponibilidade de Hip-1 então é modulada pela expansão da poliglutamina na Htt, a expansão da poliglutamina favorece a formação do heterodímero pró-apoptótico Hipp1-Hip-1. Este heterodímero pode recrutar pro-caspase-8 em um complexo de Hipp1, Hip-1 e pro-caspase-8, e ativar a cascata apoptótica pela via extínseca. A ativação desta via ativa enzimas proteolíticas, liberando o citocromo C e os fatores de indução de apoptose, como a caspase-3 das mitocôndrias pela via intrínseca, resultando numa clivagem inicial de mHtt produzindo fragmentos que se agregam e formam inclusões no neurônio e no seu núcleo, causando toxicidade celular, além da sua agravante modulação da transcrição gênica (GERVAIS et al, 2002; MATTSON, 2002; NITAI et al, 2008).

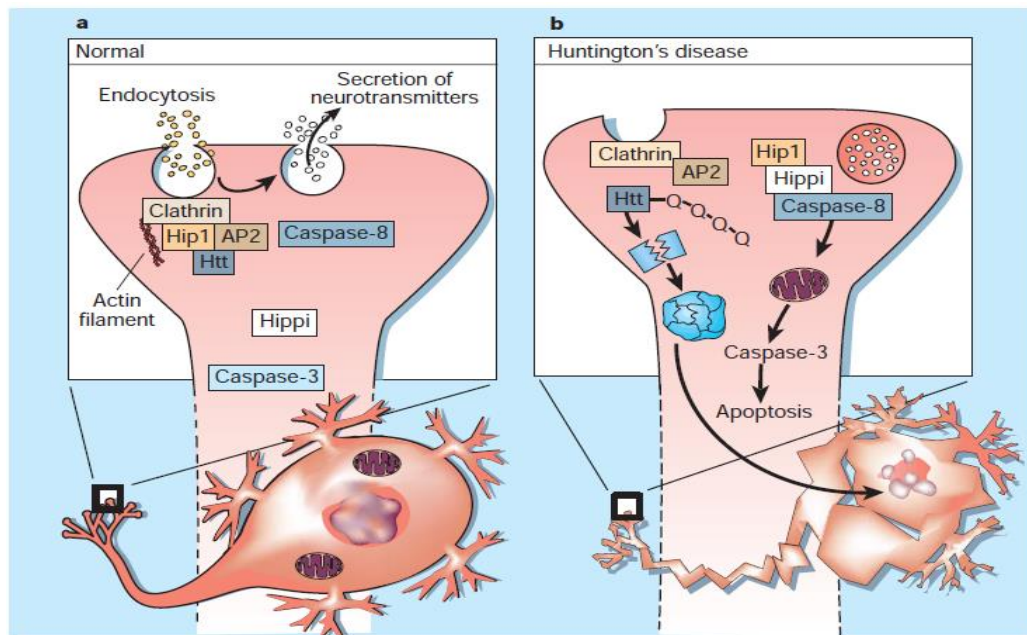


Figura 3 – Mecanismo de ação da Htt nos neurônios: a) atividade normal da Htt. b) atividade da mHtt.

Fonte: extraída de (Gervais et al, 2002).

É observado que a herança genética para a DH apresenta proporções aproximadamente iguais entre homens e mulheres, um heterozigoto para a doença transmite a característica para metade de sua prole, e que tanto o fenótipo quanto a taxa de progressão da doença são influenciados negativamente pela existência de um segundo gene afetado pela mutação (SQUITIERI et al., 2003). Em alguns casos raros, a doença pode ser causada por uma nova mutação onde nenhum dos progenitores tenha as repetições expandidas (SEMAKA et al., 2006).

A transmissão da DH não está diretamente vinculada ao sexo do progenitor afetado, mas é a principal determinante da mudança do tamanho de repetições CAG. Descendência de pais afetados são mais propensos a ter expansões, por outro lado, descendentes de mães afetadas são mais propensos a ter uma redução no tamanho CAG. Pois há uma instabilidade maior na espermatogênese do que na oogênese (KREMER et al., 1995).

Embora haja uma forma juvenil rara da DH (DHJ), normalmente definida com início até os 20 anos, associada a mais de 60 repetições de CAG, a DH

se apresenta usualmente na meia idade entre 35 a 55 anos. Entretanto a doença pode ocorrer em qualquer idade de 1 a 80 anos (RAWLINS, et al., 2016; QUARRELL, et al., 2012; VAZ; PAIVA, 2016). E faz-se um prognóstico de vida estimado em 15 a 20 anos após o aparecimento das manifestações clínicas (CATTANEO et al., 2005; ROSS, 2011).

A prevalência global da DH varia mais de dez vezes entre diferentes regiões demográficas. As menores taxas estão entre os asiáticos e as mais altas entre os caucasianos. A taxa de prevalência média desde 1995 (quando o teste genético começou a ser usado rotineiramente) em países asiáticos foi de 0,42 para 100.000 habitantes. Em comparação a taxa de prevalência para o mesmo período em países com população predominantemente caucasiana, foi de 9,71 para 100.000 habitantes (RAWLINS, et al., 2016).

No Brasil a DH é ainda bastante negligenciada. Há poucos dados sobre a incidência ou prevalência da doença na população brasileira e pouca pesquisa publicada sobre o assunto no país. No entanto, de acordo com as notificações do número de mortes, a Região Sul apresentou a maior notificação de DH por 100.000 habitantes, seguida pelo Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e regiões Norte. O que pode ser explicado pela existência de um melhor sistema de cuidados de saúde na Região Sul em comparação com o resto do país, levando a um aumento da taxa de diagnóstico e registro de mortes de DH. Outro fator a ser considerado é a composição étnica da Região Sul, uma vez que mais de 70% de sua população é composta por brancos de origem européia, em contraste com a população total do Brasil, que é composta por 47% de brancos (VAZ; PAIVA, 2016).

A DH é uma doença física, psicológica e socialmente devastadora (ROOS, 2010). Conforme o aparecimento das primeiras manifestações clínicas, a doença poderá apresentar-se de diferentes formas no primeiro estágio, sendo que as alterações mais comuns se estabelecem no comportamento, como irritabilidade e depressão, quando pacientes mostram mudanças sutis de personalidade, cognição, e controle motor. Este período saudável funde-se imperceptivelmente com uma fase de pré-diagnóstico. No estágio intermediário,

o discurso se deteriora mais rapidamente do que a compreensão, e a coreia torna-se mais pronunciada. Os pacientes com início precoce DH podem não desenvolver a coreia, ou esta pode surgir apenas transitoriamente durante a sua doença. Observam-se emagrecimento e dependência para realizar atividades simples como autocuidado. Em estágio mais avançado, como os déficits motores e cognitivos se tornam graves, os pacientes eventualmente morrem, geralmente de complicações de quedas, inanição, disfagia e aspiração (WALKER, 2007). A causa mais comum de morte é a pneumonia, seguido de suicídio (ROOS, 2010).

Para pesquisa e estratificação da capacitação funcional e motora, é utilizado desde 1996, quando foi criado por um grupo de estudo internacional da DH para padronizar o exame clínico de pacientes em DH, um conjunto de escalas, testes e questionários, chamado de Escala Unificada para Avaliação da DH (UHDRS). Permitindo abrangente classificação clínica de gravidade da DH, a UHDRS faz a avaliação das incapacidades motoras, bem como o agravamento do grau cognitivo, distúrbios do comportamento e da atividade mental, autocuidado, necessidades sociais e financeiras (KEMPLÍR, 2006).

A seção motora do UHDRS avalia o nível de comprometimento motor do paciente. Com classificações padronizadas de função oculomotora, disartria, coreia, distonia, marcha e estabilidade postural. É obtido pelo somatório de pontos de 31 itens, cuja pontuação varia entre 0 e 124, com pontuações mais altas indicando comprometimento motor mais grave do que os escores mais baixos (Movement Disorder Society, 1996).

A avaliação comportamental e psiquiátrica da UHDRS inclui 28 itens que quantificam a gravidade e a frequência dos sintomas relacionados ao afeto e ao conteúdo do pensamento (tristeza/humor, baixa estima, culpa, ansiedade, pensamentos suicidas, comportamento agressivo, comportamento irritadiço, obsessões, compulsões, delírios e alucinações). A pontuação total varia entre 0-176, e os pontos mais altos indicam maior comprometimento comportamental (Movement Disorder Society, 1996).

As avaliações funcionais incluem uma escala de capacidade funcional com 5 itens que contemplam tarefas domésticas, finanças, ocupação, cuidados exigidos e atividades da vida diária (13 pontos); uma escala de independência que classifica o paciente desde não precisar de cuidados especiais até alimentado por sonda, acamado (que varia de 10% a 100%); e uma lista de verificação de tarefas diárias comuns, que abrange desde a capacidade para manter um serviço remunerado na sua atividade profissional até as tarefas de higiene e alimentação executadas sem auxílio. Consiste em um questionário de 25 perguntas (25 pontos), podendo ser preenchida através da informação do doente ou do seu acompanhante. Os escores mais altos nas escalas de função indicam melhor funcionamento. (Movement Disorder Society, 1996).

O Índice de capacidade funcional total da UHDRS traduz o estágio geral dos participantes e é classificado de acordo com a escala de Shoulson e Fahn, e varia entre os estágios 1 e 5. Este é avaliado conforme a capacidade do paciente sobre atividades básicas administrativas e diárias. Os menores pontos indicam melhor integridade e preservação de funções (SHOULSON; FAHN, 1979). Neste estudo, foi dividido o estágio geral em leve (índice 1 e 2), moderado (índice 3) e grave (índice 4 e 5).

Para confirmação da DH é feito o diagnóstico molecular, através de um teste genético com uma amostra de sangue, onde são avaliadas as expansões do CAG. Esta confirmação é importante da mesma forma para diagnósticos diferenciais, pois a coreia, um dos sinais mais proeminentes da DH, está presente também em outras doenças. Mas somente em cerca de 1% dos casos diagnosticados clinicamente como DH, o teste genético não confirma o diagnóstico (ROOS, 2010).

Além do diagnóstico clínico com a anamnese e a constatação dos sinais e sintomas característicos da doença e a história familiar positiva, são realizados também a análise genética e exame de neuroimagem como a ressonância magnética nuclear, para identificar as regiões alteradas dos núcleos caudados e putâmen, responsáveis pelos sintomas clínicos.

A fisiopatologia da DH abrange todo o cérebro do paciente, sendo as regiões mais afetadas os núcleos da base, especialmente o estriado, composto pelo núcleo caudado e putâmen. O corpo estriado é composto principalmente de neurônios espinhosos médios (MSNs) (85%), que são neurônios gabaérgicos, os primeiros afetados na DH por um mecanismo apoptótico, mas também de interneurônios, incluindo neurônios colinérgicos (RÜB, 2016; VONSATTEL et al., 1998; RIBEIRO et al, 2013; ZUCCATO; CATTANEO, 2009). A perda da inibição pelos neurônios gabaérgicos permite descargas espontâneas de atividade do globo pálido e da substância negra que provocam os movimentos de coreia. Já os sintomas clínicos cognitivos provavelmente não resultam da perda dos neurônios GABA (ácido gama amino butírico), mas sim, de neurônios secretores de Ach (acetilcolina), provavelmente localizados nas áreas do córtex cerebral (VONSATTEL et al., 1985).

Portanto, o marcador patológico da DH é a atrofia gradual do estriado, que segue um padrão de progressão topograficamente ordenado. O envolvimento de camadas do córtex cerebral e disfunção de circuitos cortico-estriatais sugere que o processo de doença pode começar no estriado e no córtex, estendendo-se a outras regiões cerebrais subcorticais, e que a liberação maciça de glutamato, pela teoria glutamatérgica, pelos terminais cortico-estriatais pode ser responsável por reforçar como causa de neurodegenerescência a excitotoxicidade no estriado (JANUÁRIO, 2011).

A DH é caracterizada por seu início tardio, portanto, reproduzir o fenótipo da DH humana no período de vida de um camundongo representa um grande desafio. Inúmeros modelos de camundongos expressando Htt completo (YAC, BAC e knock-in) ou fragmentos (R6/2 e N-171) foram desenvolvidos para estudos terapêuticos e para melhor compreensão da patogênese da doença (MENALLED e CHESSELET, 2002; EHRNHOFER et al., 2009; CROOK e HOUSMAN, 2011; MUNOZ-SANJUAN e BATES, 2011). No entanto, os modelos de camundongos são em geral limitados para o estudo de certas medidas funcionais e comportamentais (figura 4) (HERRMANN et al., 2012). Por isso é importante analisar as diferenças entre os modelos existentes, pois nenhum modelo pode ser considerado superior aos outros em todos os

aspectos, sendo que o uso de mais de um modelo animal deva ser considerada, embora o custo de rastreamento também (MENALLED et al., 2009).

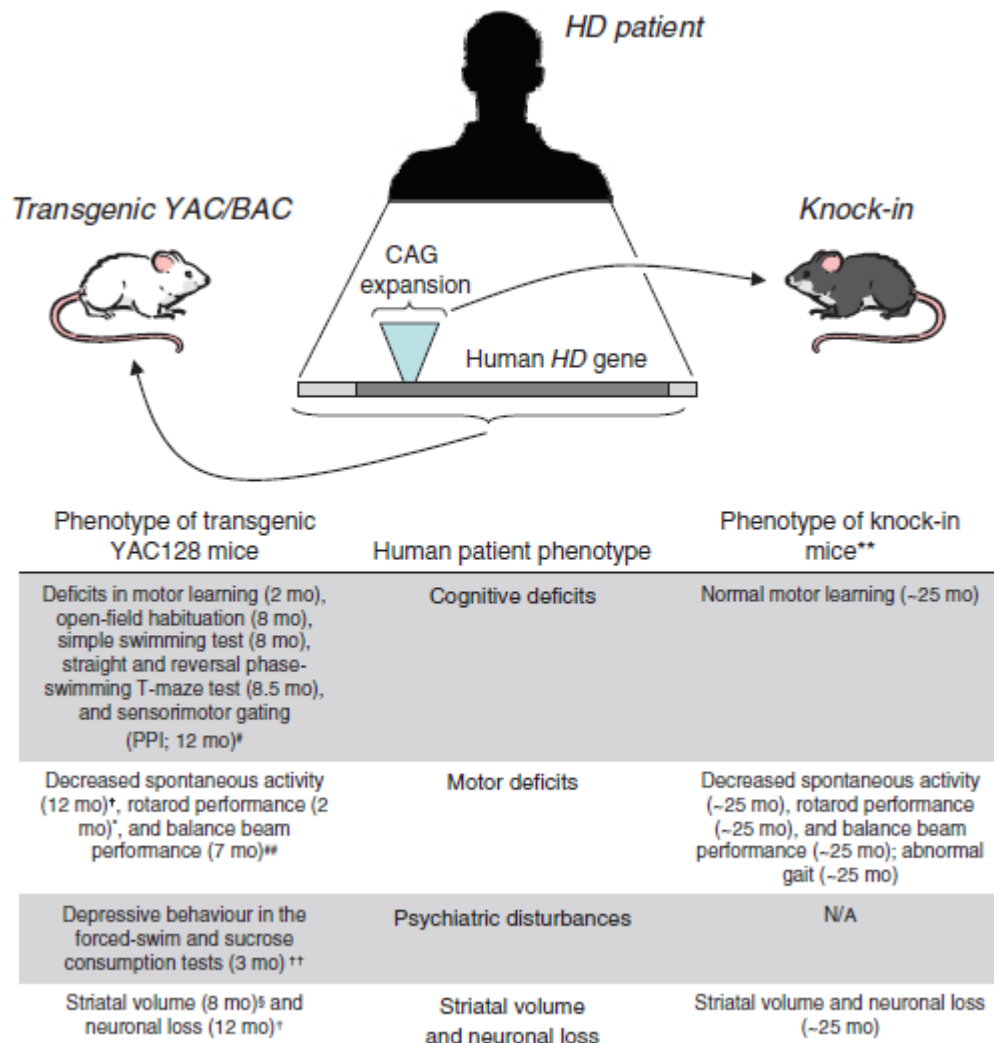


Figura 4 – Comparação de fenótipos entre modelos de camundongos de DH transgênicos e knock-in e pacientes humanos com DH.

Fonte: extraída de (Ehrnhoefer et al, 2009).

Os camundongos knock-in HdhQ111, possuem uma sequência poliQ inserida no gene endógeno da Htt do camundongo (SHELBOURNE et al., 1999), exibem um fenótipo de início muito tardio com doença sutil que maximiza a investigação de eventos precoces da doença. A doença é mais

rápida em camundongos transgênicos de DH YAC e BAC, levando à perda de células neuronais (MACDONALD et al, 2003). Os camundongos BACHD exibem déficits motores progressivos e neurodegeneração seletiva de início tardio no córtex e estriado, consistentes com os achados nos animais YAC (EHRNHOFER et al, 2009). Os camundongos transgênicos com fragmento de Htt, como os camundongos exon 1 (R6/2 e N-171), apresentam doença grave e rápida, com morte entre 12 e 14 semanas de idade (figura 5).

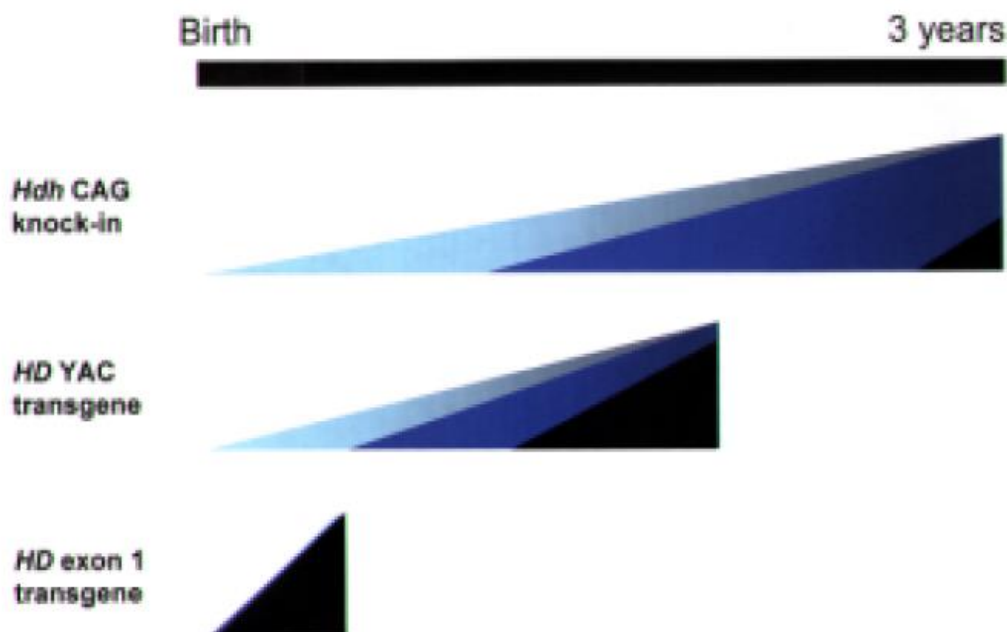


Figura 5 – Descrição do tempo dos eventos em modelos de camundongos de DH. A cascata da doença está dividida em: alterações moleculares precoces (triângulo azul claro), marcadores patológicos posteriores, como inclusões intranucleares (triângulo azul escuro), e até mesmo sinais posteriores de doença em estágio terminal, incluindo perda de células neuronais e morte do camundongo (triângulo preto).

Fonte: extraída de (MacDonald et al, 2003).

Os modelos transgênicos que expressam a Htt completa YAC128 e BACHD possuem uma origem pura FVB/N, enquanto que a maioria dos

modelos que expressam fragmentos de Htt (R6/2 e N-171) e modelos knock-in possuem uma origem mista de C57BL/6 (Tabela 1) (EHRNHOFER et al, 2009). Sendo que uma das teorias de neurodegeneração seletiva é a excitotoxicidade causada pela ativação de receptores de glutamato (POULADI et al., 2006; JANUÁRIO, 2011). Evidências crescentes revelam que há um forte componente genético que influencia a suscetibilidade à excitotoxicidade; os antecedentes da cepa C57BL/6 confere mais resistência à maioria das excitotoxinas examinadas quando comparado com os antecedentes do FVB/N (SCHAUWECKER, 2005). Essa diferença na suscetibilidade à morte neuronal excitotóxica pode ser o motivo das diferenças na gravidade dos fenótipos knock-in e YAC/BAC.

Tabela 1 Diferenças entre os modelos de DH

Mouse HD model	CAG size	Strain	References
R6/2 model	115-150 CAG	CBA C57BL/6 mixed background	Mangiarini et al., 1996
N-171 model	18, 44, 82 CAG	C3H/HEJ C57BL/6JF1 mixed background	Schilling et al., 1999
YAC models	18, 46, 72, 128 CAG	FVB/N	Hodgson et al., 1999; Slow et al., 2003
BACHD model	97 CAG	FVB/NJ	Gray et al., 2008
Knock-in models	72-80 CAG	129/Svx C57BL/6 mixed background 129/Svx FVB/N mixed background	Shelbourne et al., 1999
	50, 92, 111 CAG	129/CD1 mixed background	Wheeler et al., 2000
	94, 140 CAG	129/Sv C57BL/6 mixed background	Menalled et al., 2002; Menalled et al., 2003
	150 CAG	129/Ola C57BL/6J mixed background	Lin et al., 2001

Fonte: extraída de (Ehrnhoefer et al, 2009).

Em estudo realizado no Departamento de Neurobiologia Molecular (dados disponíveis na página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE50379>), foram investigadas possíveis alterações no perfil de expressão gênica no estriado, em modelo animal de DH (*HdhQ111/Q111/mGluR5-/-* e *HdhQ20/Q20/mGluR5+/+*), por ensaio de microarranjo, que revelou variações na regulação de muitos genes.

O ensaio de microarranjo é uma técnica de hibridização que permite a investigação da análise da expressão de milhares de genes ao mesmo tempo.

Para tal, utiliza matrizes contendo sondas complementares a diversos genes e permite, por técnicas de hibridização com o cDNA-alvo marcado com fluoróforo, avaliar a expressão gênica. Porém o método é basicamente qualitativo, ou seja, de rastreio. Por tal motivo a PCR em tempo real é utilizada como uma técnica de apoio para validar e quantificar os genes de interesse nas análises de microarranjo. Portanto, uma combinação sinérgica de ambas as tecnologias, nas quais o rastreio dos genes envolvidos é realizado por microarranjo e a quantificação precisa de alto rendimento é feito por PCR em tempo real, seria o mais adequado método de escolha. (KLEIN, 2002; NASCIMENTO et al, 2010).

Dessa maneira, na pesquisa de Ribeiro e colaboradores (2014), foi confirmado através de PCR em tempo real, que existe alteração na expressão de vários genes no estriado de modelo animal de DH, principalmente com relação ao gene que codifica a proteína dineína, pois em modelo animal de DH, que não possuíam o receptor metabotrópico de glutamato mGluR5 (*HdhQ111/Q111/mGluR5^{-/-}*), o perfil de expressão gênica no estriado, resultantes da mHtt, mostrou regulação positiva dos genes da Dineína de cadeia pesada axonemal 6 (*DNAHC6*) e da Dineína de cadeia leve Tctex do tipo 1 (*DYNLT1*) (RIBEIRO; PIRES et al., 2014).

A proteína motora Dineína foi descoberta em 1987 (LYE et al., 1987), e é composta por duas cadeias pesadas, três cadeias intermediárias, e quatro cadeias leves (PASCHAL et al.,1987). Pertence a uma superfamília de proteínas motoras que se movem da porção distal sobre os microtúbulos em direção ao corpo celular, participando do transporte retrógrado (VALLEE et al., 2004).

Neste sentido, em estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa (AREAL et al., 2017), verificou-se uma diminuição significativa na expressão do gene *DNAHC6* em pacientes com DH e em animal modelo DH (*HdhQ111/Q111* e *HdhQ20/Q20*). Sugerindo a *DNAHC6* como um possível marcador sanguíneo para as primeiras alterações celulares que antecedem as manifestações da DH. Ou seja, a alteração na expressão gênica de *DNAHC6* observada em

modelo animal da DH também foi observada em pacientes. Além de investigar, através de ensaio de microarranjo, uma regulação negativa de vários genes, incluindo a *DNAHC6*, a protocaderin-21 (*Pcdh21*), o Receptor intracelular sigma 1 não-opiíide (*SIGMAR1*), o Domínio 1 do tipo imunoglobulina e repetição rico em leucina (*Lingo1*) e o Receptor gama-aminobutírico A (*Gabra2*). Sendo estes os genes de interesse abordados neste trabalho, além do gene da *DYNLT1* citado na pesquisa de Ribeiro e colaboradores (2014).

Este mesmo estudo concluiu que o monitoramento molecular da expressão do gene *DNAHC6* em indivíduos com história familiar de DH poderia ser aplicado como uma tentativa de antecipar o diagnóstico, indicar o prognóstico da doença e, conseqüentemente, um início precoce do tratamento. No entanto, é importante notar que não se pôde determinar com precisão em que ponto esta alteração molecular se iniciou, considerando que todos os pacientes avaliados já apresentavam sintomas da DH bem definidas (AREAL et al., 2017). O que dá suporte para avaliar a expressão do gene *DNAHC6* em pacientes e em modelo animal de DH, em diferentes estágios da doença, assim como, em familiares assintomáticos com diagnóstico molecular de DH.

Dessa forma, esses dados são essenciais para determinarmos que os resultados, obtidos em modelo animal, apresentam relevância clínica. Isto nos dá suporte para avaliar a expressão do gene *DNAHC6* em pacientes em diferentes estágios da doença, assim como, analisar em humanos, expressões de outros genes alterados em modelo animal. Proporcionando um melhor entendimento dos mecanismos que levam aos sintomas clínicos da DH.

Dentre os vários genes alterados por ensaio de microarranjo, foram selecionados os genes *DNAHC6*, *DYNLT1*, *SIGMAR1*, *Lingo1*, *Pcdh21* e *Gabra2*, que já possuem relação com doenças neurodegenerativas, ou até mesmo já com a DH, descritas na literatura (AREAL et al., 2017; RIBEIRO; PIRES et al., 2014; NGUYEN, et al., 2015; MI, et al., 2008; KIM et al., 2011; ALLEN, et al., 2009), para testar por PCR em tempo real, se humanos portadores da DH e animal modelo de DH apresentam essas mesmas alterações moleculares, e se há diferença de expressão destes genes em

diferentes estágios da DH em humanos e também em modelo animal para DH, complementando os estudos anteriores realizados em modelo animal de Ribeiro e colaboradores (2014) e em modelo humano e animal de Areal e colaboradores (2017).

O *SIGMAR1* é uma chaperona que reside principalmente na membrana do retículo endoplasmático associada à mitocôndria (MAM), onde desempenha um papel na manutenção da integridade estrutural e na regulação da sinalização de cálcio entre o retículo endoplasmático e a mitocôndria (figura 6), e atua como um modulador pluripotente dinâmico em sistemas vivos (WENG, et al., 2017). O gene *SIGMAR1* é expresso nos neurônios e nas células da glia, em múltiplas partes do SNC. É uma classe única de proteínas intracelulares que pode modular muitos mecanismos biológicos associados à neurodegeneração. As doenças neurodegenerativas com etiologias genéticas e fenótipos patológicos distintos parecem compartilhar mecanismos comuns de disfunção celular neuronal, incluindo excitotoxicidade, desregulação do cálcio, dano oxidativo, estresse do retículo endoplasmático e disfunção mitocondrial. As células da glia, incluindo micróglia e astrócitos, desempenham um papel cada vez mais reconhecido, tanto na promoção quanto na prevenção da neurodegeneração (NGUYEN, et al., 2015). A expressão do gene do *SIGMAR1* está envolvida na diferenciação celular, neuroplasticidade, neuroproteção, e funcionamento cognitivo do cérebro. O receptor *SIGMAR1* afeta a sinalização intracelular de cálcio e exerce uma importante influência neuromoduladora em vários sistemas de neurotransmissores, incluindo o sistema colinérgico e glutamatérgico do tipo NMDA que estão implicados tanto no Alzheimer quanto na DH. Agonistas do receptor de *SIGMAR1* mostram potentes efeitos neuroprotetores in vitro e em modelos animais de neurodegeneração (FEHÉR, et al., 2012).

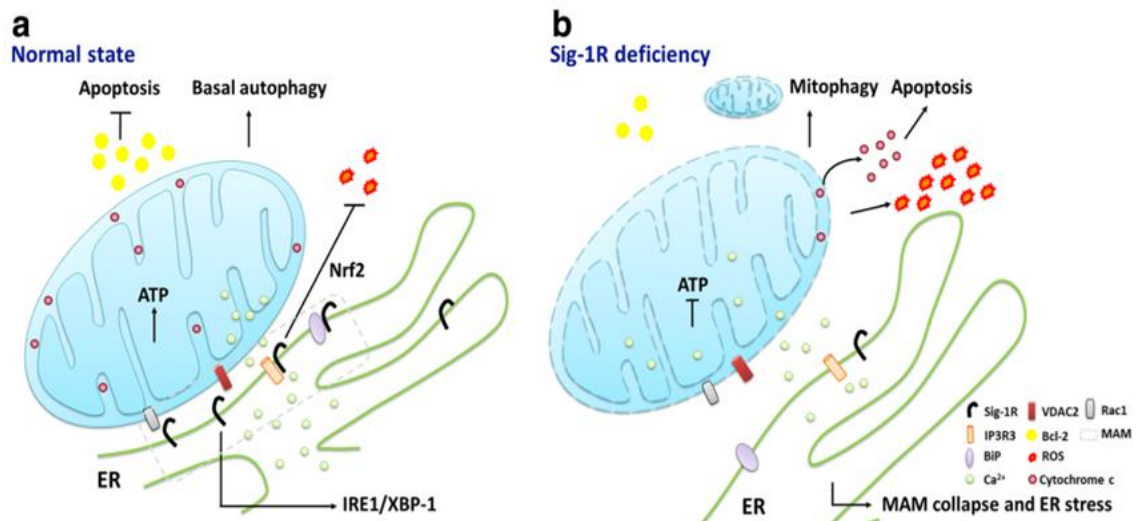


Figura 6 – Suposto mecanismo *SIGMAR1* na MAM: a) No estado normal. b) No estado de deficiência de *SIGMAR1* - leva a uma sinalização anormal de Ca²⁺ entre o Retículo Endoplasmático (ER) e mitocôndrias e a interrupção da produção de ATP. Aumento da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), aumentando a liberação de citocromo c e levando ao colapso da MAM e, conseqüentemente, o aumento da autofagia ou morte celular por apoptose.

Fonte: extraída de (Weng et al, 2017).

O gene do *Lingo1* é expresso seletivamente no SNC em células precursoras de oligodendrócitos e em neurônios. Sua expressão é moderada no desenvolvimento normal do SNC e é regulada positivamente tanto em humanos quanto em modelos de camundongos para neuropatologias. *Lingo1* regula negativamente (figura 7) a diferenciação de oligodendrócitos e mielinização, a sobrevivência neuronal e regeneração axonal através da ativação de vias de sinalização da fosforilação da família de gene homólogo ras, membro A (RhoA) e inibindo a proteína cinase B (Akt). Através de diversos modelos animais de doenças do SNC, tendo como alvo a inibição do *Lingo1*, observou-se que há promoção da sobrevivência de neurônios e oligodendrócitos, regeneração do axônio, diferenciação de oligodendrócitos, remielinização e recuperação funcional. A inibição específica de função *Lingo1* representa uma nova abordagem terapêutica para o tratamento de doenças do

SNC (MI, et al., 2008; MI, et al., 2013). O *Lingo1* traduz uma glicoproteína de membrana específica do SNC que suprime a diferenciação do oligodendrócito e a mielinização, *Lingo1* está possivelmente envolvido na falha da remielinização e no reparo axonal na esclerose múltipla, o bloqueio do *Lingo1* através de BIIB033, um anticorpo monoclonal totalmente humano que antagoniza seletivamente o *Lingo1*, que mostrou ser seguro e bem tolerado em estudos de fase 1, permitiu a ativação da remielinização e demonstrou redução significativa da perda axonal (CORREALE, et al., 2016).

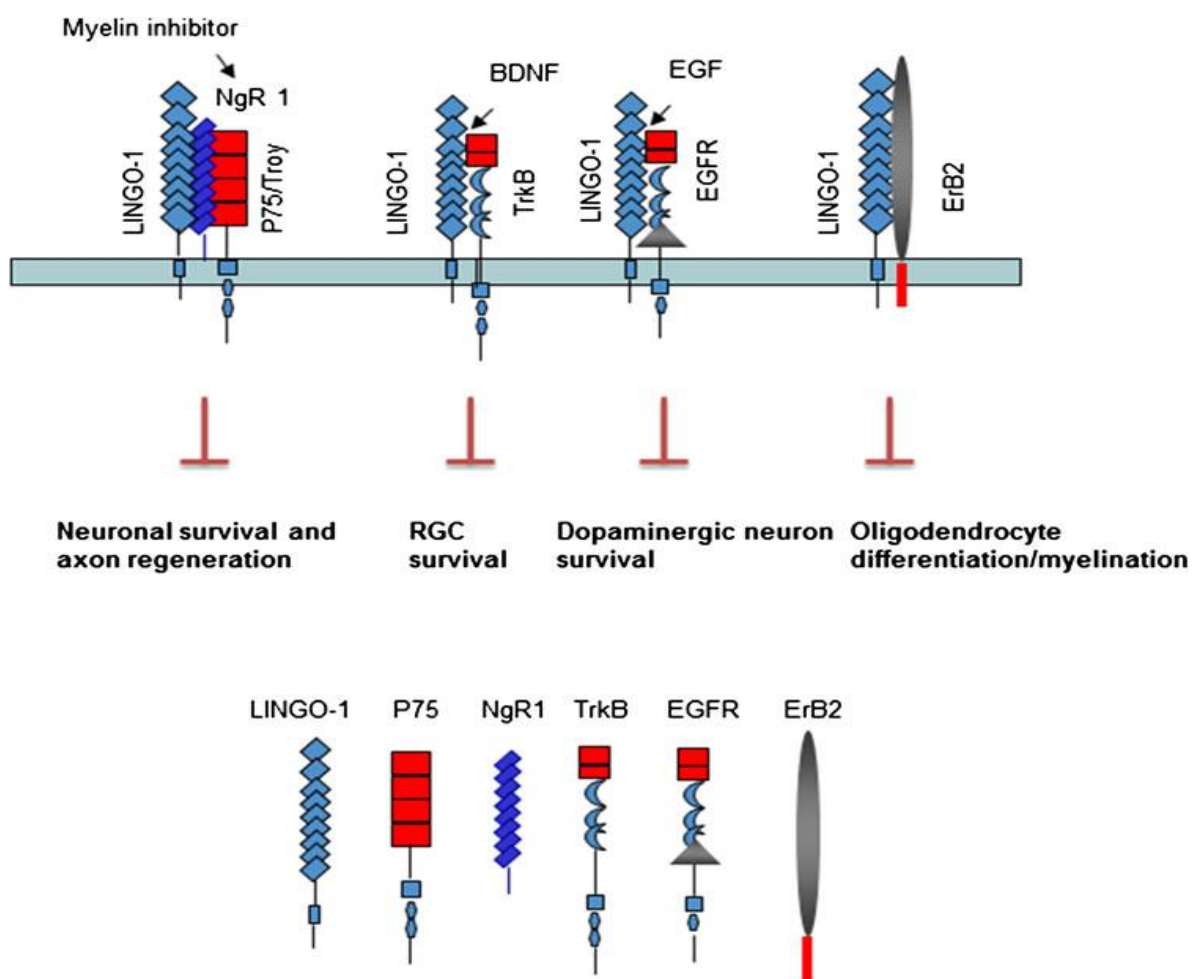


Figura 7 – Complexos de sinalização *Lingo1* (*Lingo1* regula negativamente moléculas de sinalização).

Fonte: extraída de (Mi et al, 2013).

O gene da *Pcdh21* expresso predominantemente no SNC é conhecido como um gene fotorreceptor específico. Sua alteração é de importante interesse, pois pode afetar fotorreceptores (figura 8) e induzir disfunções visuais (KIM et al., 2011). Os distúrbios do movimento ocular são bastante conhecidos na DH (LEIGH, et al., 1983; HELMLINGE, et al., 2002; ANDERSON; MACASKILL; 2013). A visão de cor é significativamente menor em pacientes com DH, sendo o volume da mácula diminuído com o aumento da gravidade da DH. A camada de fibra nervosa da retina (RNFL) na região temporal foi identificada como preferencialmente afetada na DH, possivelmente implicando em disfunção mitocondrial. Além disso, a espessura da RNFL temporal é reduzida em pacientes com DH e é inversamente correlacionada com a duração da doença (KERSTEN, et al., 2015).

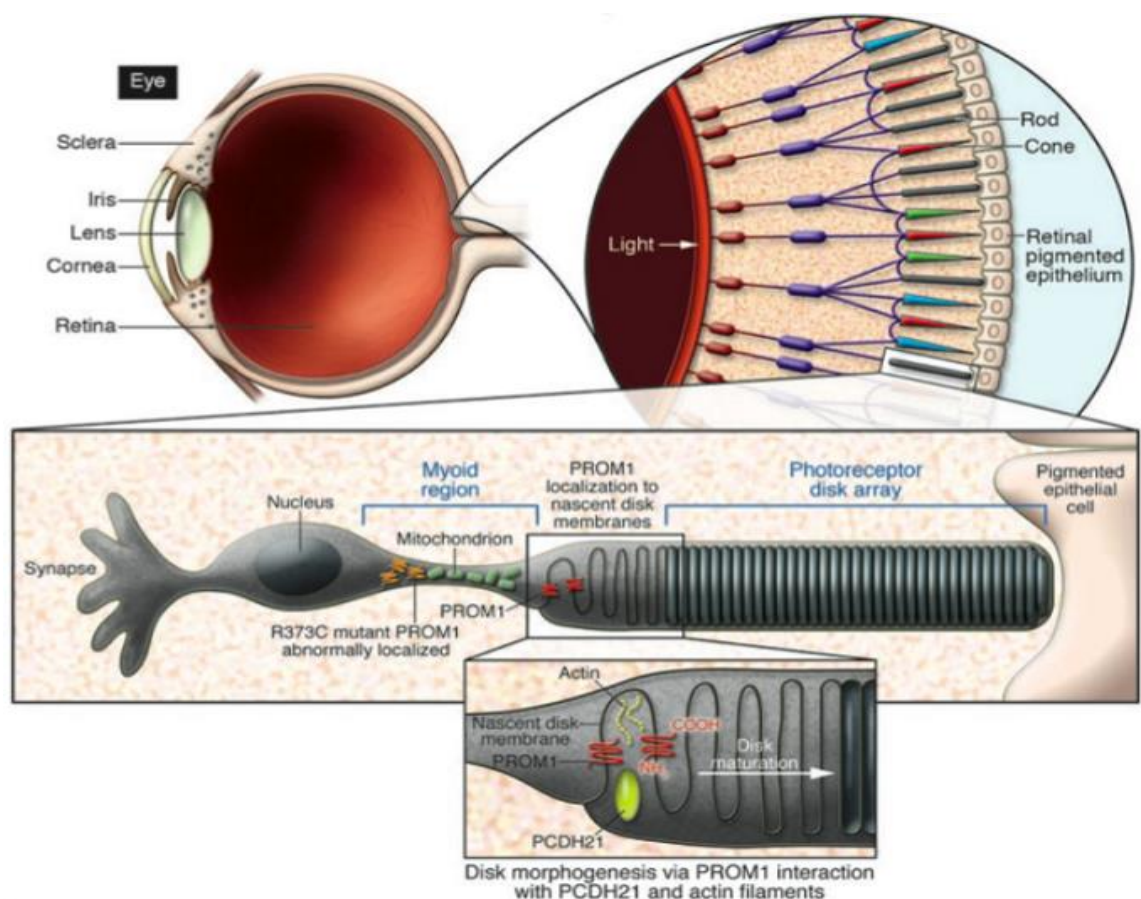


Figura 8 – *Pcdh21* interage com filamentos de actina e outras proteínas causando distrofia macular.

Fonte: extraída de (Kleinman and Ambati, 2008).

O gama-aminobutírico é o principal neurotransmissor inibitório do SNC e desempenha um papel importante no funcionamento dos gânglios da base de mamífero. Existem dois tipos de receptores de GABA, os ionotrópicos e os metabotrópicos. Os receptores *Gabra2* são receptores ionotrópicos, mais abundantes no SNC, com estrutura pentamérica com um canal de cloreto e é montado a partir de uma gama de diferentes classes de subunidades, sendo 19 subunidades. Estudos mostram que há um aumento do número de receptores *Gabra2* que aumentam a capacidade de neurônios do globo pálido (GP) para compensar a diminuição progressiva da quantidade de GABA liberado no GP na DH (ALLEN, et al., 2009; GLASS, et al., 2000). O receptor *Gabra2* apresenta um aumento irregular da perda no núcleo caudado e putâmen no início da DH e uma perda quase total de receptores no núcleo caudado e putâmen nos graus mais avançados de DH. Um aumento do receptor *Gabra2* no estriado é incomum, e pode representar o início da disfunção dos neurônios espinhosos médios, na ausência de qualquer degeneração visível (GLASS, et al., 2000; GLASS, et al., 2004).

A DH é a causa genética mais comum de movimentos involuntários arrítmicos (GONÇALVES, 2013). E apesar de atualmente existirem numerosos estudos na área, principalmente o que se refere à correlação da expansão da repetição CAG como principal determinante da idade de início dos sintomas clínicos da DH, o mesmo comprimento de poliglutamina em diferentes indivíduos pode produzir o início que varia dentro de um período aproximado de 36 anos (MACDONALD et al., 2003). Portanto, as etapas chave no processo da doença podem ser modificadas por fatores aleatórios, ambientais ou genéticos que determinarão a idade precisa do início da DH, por isso a importância do monitoramento de alterações moleculares precoces. Dessa forma, esta pesquisa pretende colaborar com os avanços no conhecimento desta doença, os quais irão contribuir para o desenvolvimento de marcadores moleculares que possam efetivamente identificar as primeiras alterações celulares que antecedem as manifestações clínicas da DH, de forma mais específica e precoce, pois quanto mais cedo o diagnóstico molecular for

identificado, o tratamento pode atuar por mais tempo, proporcionando uma melhora na qualidade de vida do paciente e de seus familiares.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Determinar se as alterações na expressão gênica observadas em modelo animal geneticamente modificado para DH podem ser marcadores moleculares em pacientes com DH.

Objetivos Específicos:

- Investigar a expressão dos genes *DNAHC6*, *DYNLT1*, *Pcdh21*, *SIGMAR1*, *Lingo1* e *Gabra2* no camundongo BACHD em diferentes estágios da doença (4 e 12 meses de idade);
- Avaliar o estágio clínico dos portadores de DH através da Escala Unificada para avaliação da Doença de Huntington (UHDRS);
- Investigar a expressão dos genes *DNAHC6*, *DYNLT1*, *Pcdh21*, *SIGMAR1*, *Lingo1* e *Gabra2* nos pacientes com DH como um possível marcador sanguíneo para as primeiras alterações celulares que antecedem as manifestações clínicas da DH;
- Correlacionar o padrão de expressão do gene *DYNLT1* em diferentes estágios da doença em pacientes com DH.

Diante o exposto, daremos seguimento a este trabalho na forma de artigo.

Abstract

Huntington's disease (HD) is a fatal neurodegenerative disease caused by an expansion of CAG nucleotide sequence in the huntingtin gene, characterized by motor dysfunction, cognitive deficits and psychiatric symptoms. A *knock-in* genetic mice model of HD showed alterations in several genes in striatum.

Through microarray were selected the Dynein, axonemal, heavy chain 6 (*DNAHC6*), Dynein light chain Tctex, type 1 (*DYNLT1*), Sigma non-opioid intracellular receptor 1 (*SIGMAR1*), Leucine rich repeat and Ig domain containing 1 (*Lingo1*), Protocadherin 21 (*Pcdh21*) and Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor (*Gabra2*) genes, which have a relation to neurodegeneration. The aim of this study was to test whether human HD carriers have these same molecular alterations, and if there are difference in expression of these genes at different stages of HD in humans and also in animal model for HD. A BACHD transgenic mice model was investigated in different stages of 4 and 12 months of age. We explored the genes expression in HD human blood and in BACHD mice brain tissue using qPCR analysis. *SIGMAR1* gene is decreased in HD and in the striatum of (4 months) BACHD, suggests this gene could be a useful peripheral blood marker of HD in early stages of the disease. *DYNLT1* gene expression in whole blood of HD patients is significant downregulated and this difference is increased in later stages of disease by monitoring patients in the time interval from 2015 to 2018. These studies confirm that these genes could usefully as peripheral markers and also targets for potential intervention in the future for HD and translational markers in HD mouse models, although continued studies are necessary.

Keywords

Huntington's disease, gene expression, biomarker, *DYNLT1*, *SIGMAR1*, molecular diagnostics.

Introduction

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant progressive neurodegenerative disorder that causes emotional, cognitive and motor impairment, with brain atrophy, particularly in the striatum region, which inevitably leads to death (ARONIN et al., 1995; DIFIGLIA et al., 1995; SHARP et al., 1995; RÜB et al., 2016a). HD is caused by a pathologic expansion of cytosine adenine guanine CAG repeats in the expansion in exon 1 of IT15 gene, which encodes the huntingtin protein (THsDCRG, 1993). Identified only in

1993, the molecular diagnostics began to be routinely used in 1995 as a genetic test with a blood sample for DH confirmation (RAWLINS et al., 2016).

For research and stratification of functional and motor skills, a set of scales, tests and questionnaires, called the Unified Huntington's Disease Rating Scale (UHDRS), has been used since 1996 when an international DH study group created to standardize the clinical examination of HD patients (MOVEMENT DISORDER SOCIETY, 1996). Allowing comprehensive clinical classification of HD, UHDRS assesses motor disabilities, as well as cognitive impairment, behavioral and mental disorders, self-care, social and financial needs (KEMPLÍR, 2006).

A number of potential targets have been identified and validated preclinically in HD models, whereas there are not yet any diseases modifying treatments that have been demonstrated to delay or slow HD in patients. In genome-wide microarray analyses of altered gene expression in striatum of a *knock-in* mice, which has the first murine exon replaced by a human exon containing 111 CAG repeats (HdhQ111/Q111), performed at the London Regional Genomics Centre (Robarts Research Institute, London, ON, CA), revealed variations in many genes (data available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE50379>).

In the research by Ribeiro et al. (2014), it was confirmed by real-time PCR that there is an alteration in the expression of several genes in the animal model of DH which did not possess the mGluR5 metabotropic glutamate receptor (HdhQ111/Q111/mGluR5^{-/-}). The gene expression profile, resulting from mHtt, showed positive regulation of *DNAHC6* and *DYNLT1* genes (RIBEIRO; PIRES et al., 2014). These genes encode the dynein protein, a motor protein composed of two heavy chains, three intermediate chains, and four light chains (PASCHAL et al., 1987).

In a previous study conducted by our research group (AREAL et al, 2017) was revealed, by microarray analyses of striatum of a *knock-in* mice, an downregulation of genes including *DNAHC6*, *Pcdh21*, *Lingo1*, *SIGMAR1* and *Gabra2*, when compared to control HdhQ20/Q20. And also was revealed

through RT-PCR, downregulation in the gene expression related to axonal transport in the basal ganglia, specifically axonemal *DNAHC6* gene (encoding dynein heavy chain 6). Those alterations in *DNAHC6*, could also be observed in the peripheral cellular blood of patients HD and *knock-in* mice (HdhQ111/Q111) (AREAL et al., 2017). Suggesting thus a involvement of the gene pathway outside of the CNS.

Therefore, these data are essential to determine that the results, obtained in an animal model, are of clinical relevance. This gives us support for evaluating the expression of the *DNAHC6* gene in patients at different stages of the disease, as well as analyzing in humans, expressions of other genes altered in animal models. Providing a better understanding of the mechanisms that lead to clinical symptoms of DH.

Among the several genes altered by microarray assay, the *DNAHC6*, *DYNLT1*, *SIGMAR1*, *Lingo1*, *Pcdh21* and *Gabra2* genes, which have a relation to neurodegenerative diseases (AREAL et al., 2017; RIBEIRO; PIRES et al., 2014; NGUYEN, et al., 2015; MI, et al., 2008; KIM et al., 2011; ALLEN, et al., 2009), were selected to test whether human DH carriers have these same molecular alterations, and if there are difference in expression of these genes at different stages of DH in humans and also in animal model for DH.

The aim of this study was to verify whether changes in a set of gene expression (*DNAH6*, *DynLT1*, *Pcdh21*, *Lingo1*, *Sigmar1* and *Gabra2*) observed in a genetically modified animal model for HD may be molecular markers in HD patients.

Materials and Methods

HD animal model

The animal model of HD is a transgenic mice mediated by bacterial artificial chromosome (BAC) (BACHD) containing a full-length genomic sequence with 97 glutamine repeats and all regulatory elements. The BACHD mice exhibit progressive motor deficits, neuronal dysfunction and late-onset selective

neuropathology that include significant striatal and cortical atrophy (GRAY et al., 2008).

BACHD transgenic mice were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). We used wildtype littermates as controls. The animals were housed in an animal care facility, on a 12-h light/ 12 h dark cycle at a constant temperature of 23 °C, with food and water provided ad libitum. Mice were euthanized at the end of 4 and 12 months of age. Brains were removed, and striatum from the brain were dissected, snap frozen, and used for the RNA extraction using Trizol reagent. Animal care was in accordance with Universidade Federal de Minas Gerais Ethics Committee on Animal Experimentation, CETEA (n° 234/2016).

Patients

Nineteen patients (12 men, 7 women), with genetically confirmed HD in various stages (mean age $55,53 \pm 14,65$ years) from different families resident in metropolitan region of Vitoria, Espírito Santo state of Brazil were selected (Table 1). The following parameters were assessed: actual age, age at clinical onset and duration of HD, route of genetic transmission, Unified Huntington's Disease Rating Scale (UHDRS) and number of CAG triplet repeats. A medical staff, composed of neurologist, geneticist and physiotherapist, from the Neurology Division of the University Hospital Cassiano Antonio Moraes (HUCAM/UFES) monitored the patients and assessed the UHDRS. DNA extraction was performed at the Laboratory of Clinical Biochemistry and Molecular Biology at UFES and RNA extraction was conducted at the Laboratory of Molecular and Behavioral Neurobiology at UFES. The molecular diagnosis was performed by laboratory Hermes Pardini, the CAG repeats were determined by DNA fragment analysis according to Möncke-Buchner et al. 2002.

Among this group of nineteen DH patients, a subgroup of six patients (4 men, 2 women), was followed in the period from 2015 to 2018.

The control group consisted of twenty healthy individuals, 11 men and 9 women (mean age $56,15 \pm 14,45$ years), with no family history of HD, age, and gender-matched with patients in the study (Table 2). After a comprehensive explanation of the study protocol, all included patients/ relatives and controls provided written informed consent.

All proceedings were in accordance with the Federal University of Espírito Santo Human Research Committee by the number 1.856.340/2016.

Table 2 Sociodemographic characteristics of HD patients and control group

Variable	Category	HD Group (n=19)	Control group (n=20)
Gender (n, %)	female	12(36,84%)	11 (55%)
	male	7 (63,16%)	9 (45%)
Age (M \pm DP)	-	55,53 \pm 14,65	56,15 \pm 14,45
Age by group (n, %)	0 - 20 years	0 (0%)	0 (0%)
	21 - 40 years	02 (10,54%)	02 (10%)
	41 - 60 years	11 (57,90%)	11 (55%)
	> 60 years	06 (31,56%)	07 (35%)
Ethnicity (n, %)	Latin European	09 (47,37%)	09 (45%)
	European non-Latin	05 (26,32%)	04(20%)
	African	3 (15,79%)	3 (15%)
	Amerindians/African	2 (10,52%)	2 (10%)
	amerindians	-	1 (5%)

DNA Extraction from Human Blood

Briefly, 4 mL of whole venous blood was collected from each study participant for molecular diagnosis. DNA extractions were carried out using salting-out method adapted from Munro and Maniatis (1989). Concentration of DNA was analyzed by NanoDrop™ (Thermo Scientific, Wilmington, USA). Subsequently sent to Hermes Pardini laboratory for molecular diagnosis.

RNA Extraction from Human Blood

Whole venous blood (4 mL) was collected from each study participant for gene expression analysis. RNA extractions were carried out using Brazol reagent as per manufacturer's instructions (LGC Biotecnologia). RNA quality was assessed using agarose gel electrophoresis, and its concentration was analyzed by

NanoDrop™ (Thermo Scientific, Wilmington, USA). Complementary DNA (cDNA) was synthesized using iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) as per the manufacturer's protocol and S1000 thermal cycler (Biorad, CA, USA).

Quantitative RT-PCR

For each gene of interest, primers were designed using the NCBI and IDT primer quest program and the primers were tested using the relative standard curve method. The amplification consisted of an initial denaturation cycle at 95 °C for 15 s, followed by 45 cycles of 2 min at 95 °C, 30 s at 60 °C (annealing), and 30 s at 72 °C (amplification). Quantitative PCR was performed at the Applied Biosystems 7500 real-time PCR system, using SYBR Green master mix kit (Applied Biosystems). All reactions were performed in triplicate in a 10 µl total volume that contained 5,0 µl of SYBR Green and cDNA corresponding to 0.03 µl of RNA. Changes in gene expression were determined with the 2- Δ Ct method using β -actin gene expression for normalization. Specific product formation was confirmed by melting curve analysis. The primers used for the human samples and mice samples are shown in Tables 3 and 4, respectively.

Table 3 Sequences of PCR primers for human samples

Gene	RefSeq	Orientation	Sequence (5'→3')	Amplicon size
<i>DNAHC6</i>	NM_001370	Forward	TGCCACATCATCTACTCAGTTT	114 pb
		Reverse	ACCAGTATGTGGCAGTTTAGG	
<i>DYNLT1</i>	NM_006519	Forward	GTGCCTTCGGACTGTCTATTT	90 pb
		Reverse	ATTCATGGCTGGTGGTTAGAG	
<i>SIGMAR1</i>	NM_005866	Forward	AAGGAAGACCTGCGGATAGA	100 pb
		Reverse	CTCAGGATCTGCATGGTGTATG	

ACTB	NM_001101	Forward	TCCTCACCTGAAGTACCC	98 pb
		Reverse	CACACGCAGCTCATTGTAGA	

Table 4 Sequences of PCR primers for mice samples

Gene	RefSeq	Orientation	Sequence (5'→3')	Amplicon size
<i>DNAHC6</i>	NM_001164669	Forward	CGCAAGGAAGATGACACACAGA	115 pb
		Reverse	TTAGAGACCCAGCCATGACC	
<i>DYNLT1</i>	NM_009342	Forward	AGCCAACTCACCAAAGTGG	129 pb
		Reverse	GGTCTTGTCTCCCATCGG	
<i>SIGMAR1</i>	NM_011014	Forward	ACCAATGGAAAGAGGGCAC	147 pb
		Reverse	AACAGGGTAGACGGAATAACAC	
<i>Pcdh21</i>	NM_130878	Forward	GGACAGAGAAAGGGAAGATGAG	134 pb
		Reverse	ATGTAAGGCTCCTGGATGAAC	
<i>Lingo1</i>	NM_181074	Forward	GAAATTGACTATGTGCCCCG	144 pb
		Reverse	TTCCCTGCCCAGTGTTC	
<i>Gabra2</i>	NM_008066	Forward	CCATGAGGCTTACAGTCCAAG	147 pb
		Reverse	ACGGAGTCAGAAGCATTGTAAG	
ACTBN	NM_007393	Forward	TGGAATCCTGTGGCATCCATGA	122 pb
		Reverse	AATGCCTGGGTACATGGTGGTA	

Statistical Analyses

All the results were expressed as the mean \pm SEM. Statistical analysis were performed using the GraphPadPrism® software, version 7.0. Statistical evaluations of UHDRS were analyzed by one-way ANOVA. qPCR results were analyzed by Student's t test and the two-way ANOVA. A 95 % confidence interval was used and values of $P < 0,05$ were considered as statistically significant.

Results

Correlation of Age of 1st symptom with CAG repeats

As showed in Figure 9, a significant negative correlation ($p = 0.0021$, $r = -0.7093$) was observed between the number of CAG repeats in the major allele and the age of onset of the 1st symptom. The increased number of CAG repeats was associated with a younger age of onset of the first symptoms, correlation evidenced in many studies (CASTILHOS et al., 2016; BROCKLEBANK et al., 2009; WEXLER et al., 2004).

Statistical evaluation of UHDRS

It is observed in figure 10a the correlation between independence parameter and motor evaluation of the UHDRS scale, and the growth of the motor evaluation was combined with the lower the independence of the patient with DH. Since the evaluation component of the total motor goes until to 124 points and the higher the number of points, the greater the motor commitment of the patient. And the Independence scale ranges from 10% to 100%, with 10% being the same as the patient being fed by probe, bedding and 100% the patient does not need special care.

In figure 10b shows the evaluation of the motor parameters of the UHDRS scale according to the patient's gravity stage. The increase of the stage of gravity was associated with a greater motor evaluation. The gravity stage translates the index of total functional capacity and was divided into mild (general stage 1 and

2), moderate (general stage 3) and severe (general stage 3 and 4), the lower stage indicating better integrity and preservation functions.

And in figure 10c shows the evaluation of the functional evaluation of the UHDRS scale according to the patient's gravity stage. The increase of the stage of gravity was associated with a smaller functional evaluation. The functional evaluation has 25 items and ranges from 0 to 25 points, the highest number of points equals the best functional evaluation.

Table 5 shows Relationship between the clinical staging of the HD patient by the UHDRS scale and the age group. In this study, 16,68% of the patients from 41 to 60 years and 5,55% of those over 60 are in the mild stage, 5,55% from 21 to 40 years, 5,55% from 41 to 60 years and 5,55% over 60 years in the moderate stage, and 38,90% from 41 to 60 years and 22,22% over 60 years in the severe stage of HD. Therefore most of the study patients are in the range of 41 to 60 years and are in the severe phase of HD.

Table 6 demonstrates a descriptive general analysis of the components of the UHDRS scale in HD patients. The patients in the study present a mean age of the first symptoms of 49.81 years, mean of 49.88 points in the evaluation of the motor component (varies from 0 to 124 points), 18.44 points in the behavioral evaluation (varies from 0 to 176 points), 10.81 points in functional evaluation (ranging from 0 to 25 points), 5.19 points in functional capacity (ranging from 0 to 13 points), 59.38% independence (ranges from 10% to 100%) and an average disease time of 7.38 years.

Expression Levels of DNAHC6, DYNLT1, SIGMAR1, Pcdh21, Lingo1 e Gabra2 in striatum of BACHD mice model of HD

In order to further investigate *DNAHC6, DYNLT1, SIGMAR1, Pcdh21, Lingo1 e Gabra2* gene expression alteration revealed by microarray (data available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE50379>), we performed a qPCR analysis to quantify the mRNA levels of the pathway genes in the striatum of BACHD mice in early and late stages of disease progression (4 and 12 weeks).

At 4 weeks, there were already a significant decreased in mRNA levels of *SIGMAR1* (0,94-fold, $p=0,0181$), *Pcdh21* (0,91-fold, $p=0,0073$) and *Gabra2* (0,88-fold, $p=0,0103$) and no significant difference in *DYNLT1* ($p=0,2514$), *DNAHC6* ($p=0,1211$) and *Lingo1* ($p=0,2696$) as shown in Fig. 11a.

In late disease, there a was significant decrease in mRNA levels of *Gabra2* (0,90-fold, $p=0,0092$) compared with wild-type mice as shown in Fig. 11b. There were no significant differences in *SIGMAR1* ($p=0,7649$), *DYNLT1* ($p=0,1672$), *DNAHC6* ($p=0,1434$), *Lingo1* ($p=0,6850$) and *Pcdh21* ($p=0,5837$) mRNA levels in the late stage (Fig. 11b).

Furthermore, we observed a significant decrease in mRNA levels of *SIGMAR1* between younger wild type mice compared with older wild type mice and older BACHD mice. There was a significant decrease in the mRNA levels of *Gabra2* younger wild type mice compared with younger and older BACHD mice, and between older wild type mice compared with older BACHD mice (Fig. 11c).

Expression Levels of SIGMAR1, DYNLT1 and DNAHC6 Genes in the peripheral Cellular Blood of Patients with HD and age- and gender-matched controls.

To determine whether those genes are altered in HD patients, we extracted RNA from age-matched HD and healthy controls blood samples. cDNAs were synthesized and we carried out qPCR for *SIGMAR1*, *DYNLT1* and *DNAHC6* genes. There was a significant decrease in mRNA levels of *SIGMAR1* (0,72-fold, $p=0,0020$) and *DYNLT1* (0,75-fold, $p=0,0013$) as shown in Fig. 12a e 12b. Whereas *DNAHC6* mRNA was increase significantly (1,11-fold, $p=0,0467$) as shown in Fig. 12c.

Expression levels of gene DYNLT1 in the peripheral cellular blood of patients with HD quantified using qPCR in different times and in the same patients.

To further validate whether the identified mRNA alterations in expression levels of the gene *DYNLT1* are maintained at the late stages of disease progression, we carried out qPCR for *DYNLT1* gene in the same patients in 2015 and in 2018. And in fact, there was a significant decrease in the mRNA levels of

DYNLT1 at the disease progression (as shown in Fig. 13), suggesting that the *DYNLT1* gene may be a peripheral biomarker for HD.

Table 5 Relationship between the clinical staging of the HD patient by the UHDRS scale and the age group

	0 – 20 years	21 – 40 years	41 – 60 years	> 60 years
mild	0%	0%	16,6%	5,55
moderate	0%	5,55%	5,55	5,55
sereve	0%	0%	38,90%	22,22%

Table 6 Descriptive general analysis of the components of the UHDRS scale in HD patients

	Age of 1st symptom	motor	behavior	functional	TFC	Independence	disease time in years
MINIMUM	36	14	0	0	0	10	1
MEDIAN	46	48	17	10,5	4	65	7
MEAN	49,81	49,88	18,44	10,81	5,19	59,38	7,38
MAXIMUM	80	98	48	24	13	100	13
STANDARD DEVIATION	14,03	25,33	16,04	7,57	4,05	23,80	3,28

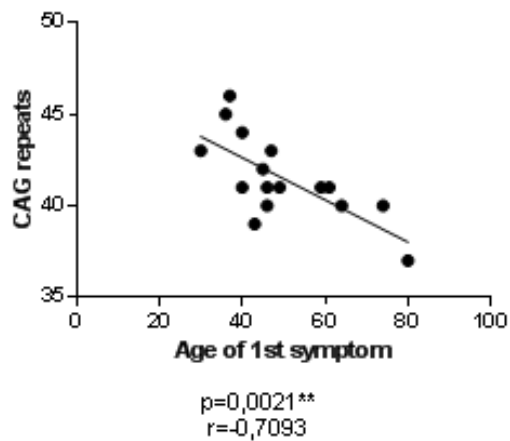


Fig. 9 Correlation of Age of 1st symptom in HD patients with CAG repeats in the major allele. The increased number of CAG repeats was associated with a younger age of onset of the first symptoms.

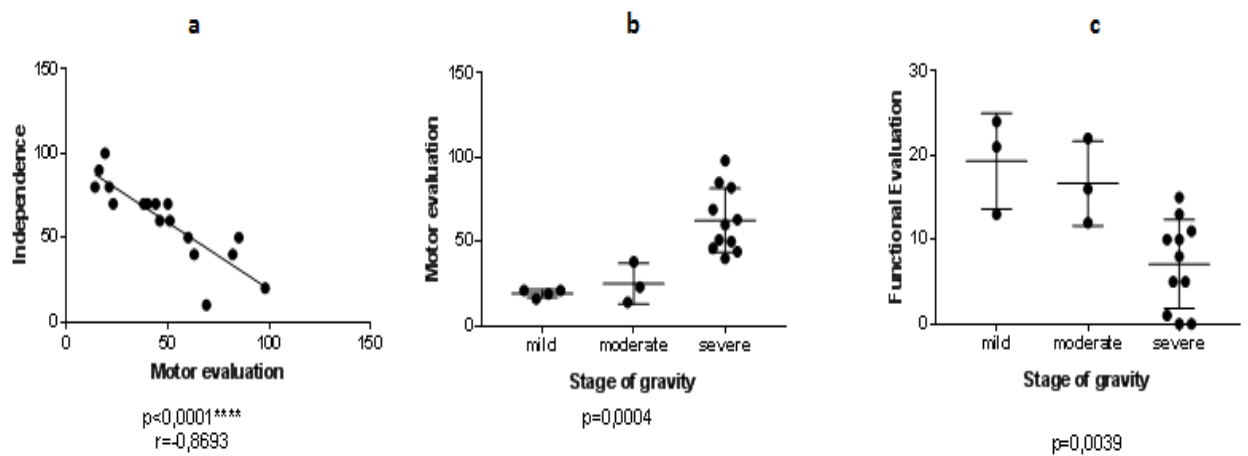
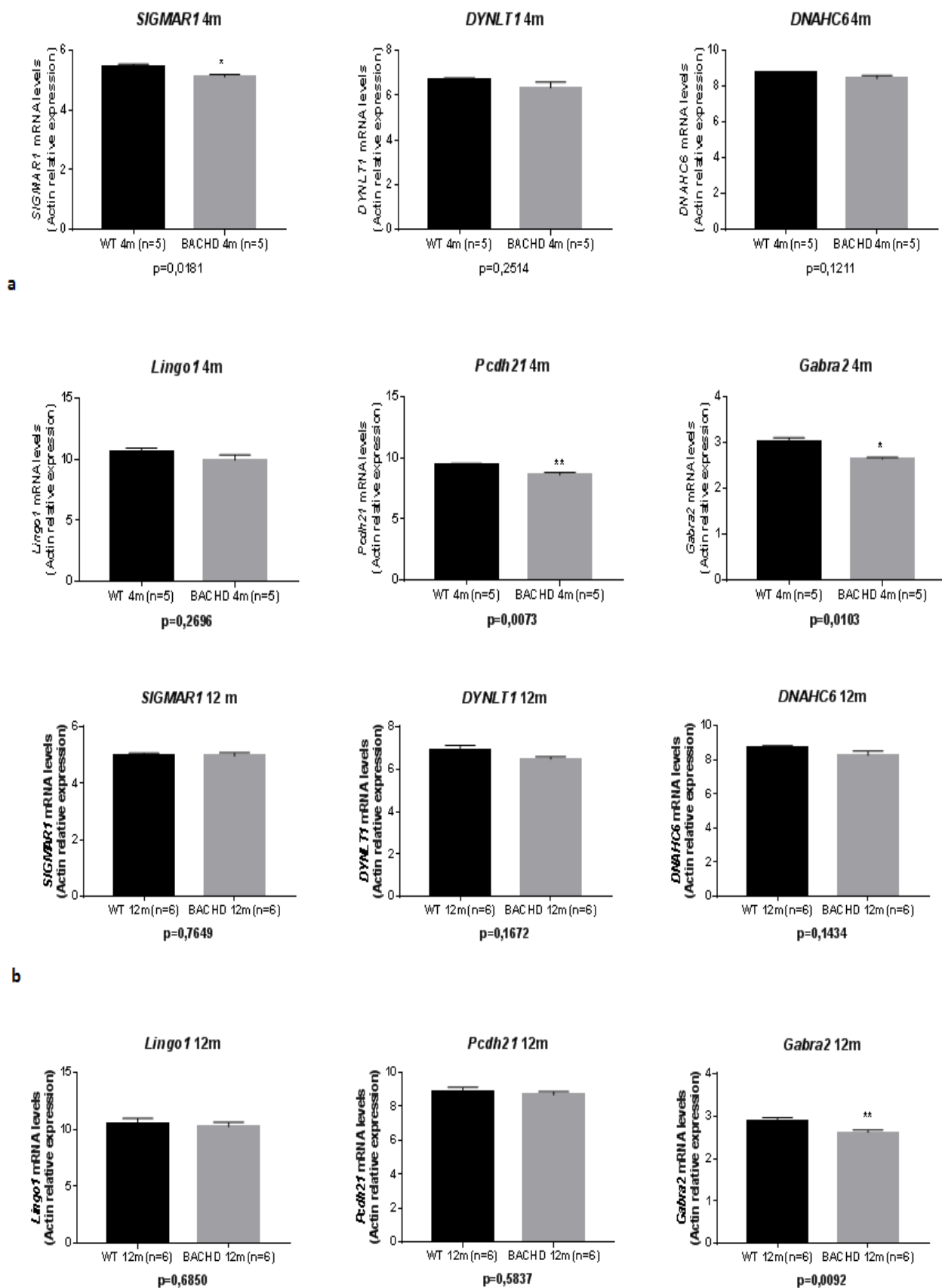


Fig. 10 Statistical evaluation of UHDRS. **a** Correlation of Motor evaluation with Independence (Pearson's correlation test). **b** Evaluation with one-way ANOVA of Stage of gravity and Motor evaluation. **c** Evaluation with one-way ANOVA of Stage of gravity and Functional evaluation.



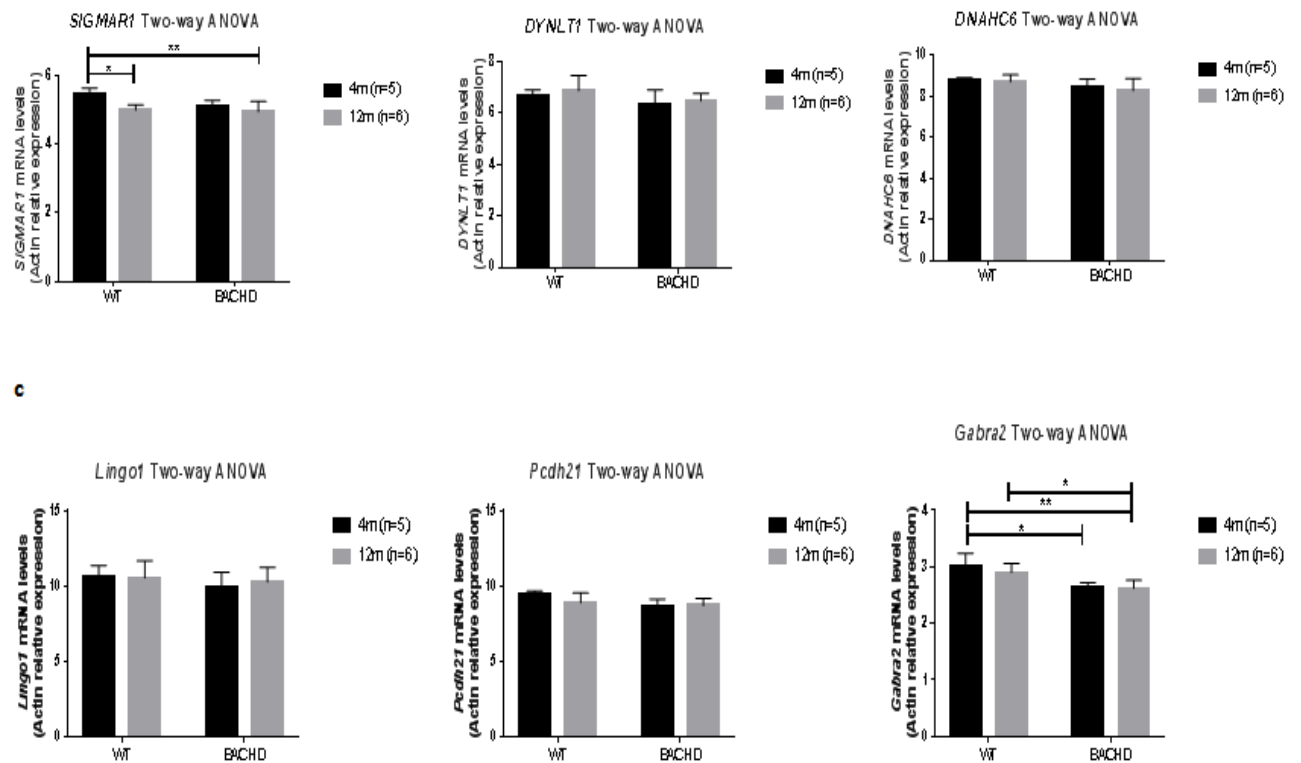


Fig. 11 Expression levels of genes *SIGMAR1*, *DYNLT1*, *DNAHC6*, *Lingo1*, *Pcdh21* e *Gabra2* in striatum of BACHD mice model of HD in early (4 months) and late stage of HD (12 months) quantified using qPCR. **a** By 4 months (early symptomatic), there are a significant decreased in the mRNA levels of *SIGMAR1*, *Pcdh21* and *Gabra2* in BACHD mice compared with wild type mice (WT). No significant difference in mRNA levels of *DYNLT1*, *DNAHC6* and *Lingo1*. **b** At 12 months (late symptomatic), there are significant decreased in *Gabra2* mRNA. There were no alteration in *SIGMAR1*, *DYNLT1*, *DNAHC6*, *Lingo1* and *Pcdh21* mRNA levels at 12 months. **c** There is a significant decreased in the mRNA levels of *SIGMAR1* between WT 4m compared with WT 12m and BACHD 12m. There is a significant decreased in the mRNA levels of *Gabra2* WT 4m compared with BACHD 4m and BACHD 12m, and between WT 12m compared with BACHD 12m. Expression was normalized with β -actin. Data were expressed as mean \pm S.E.M. *p 0.05, compared with the control

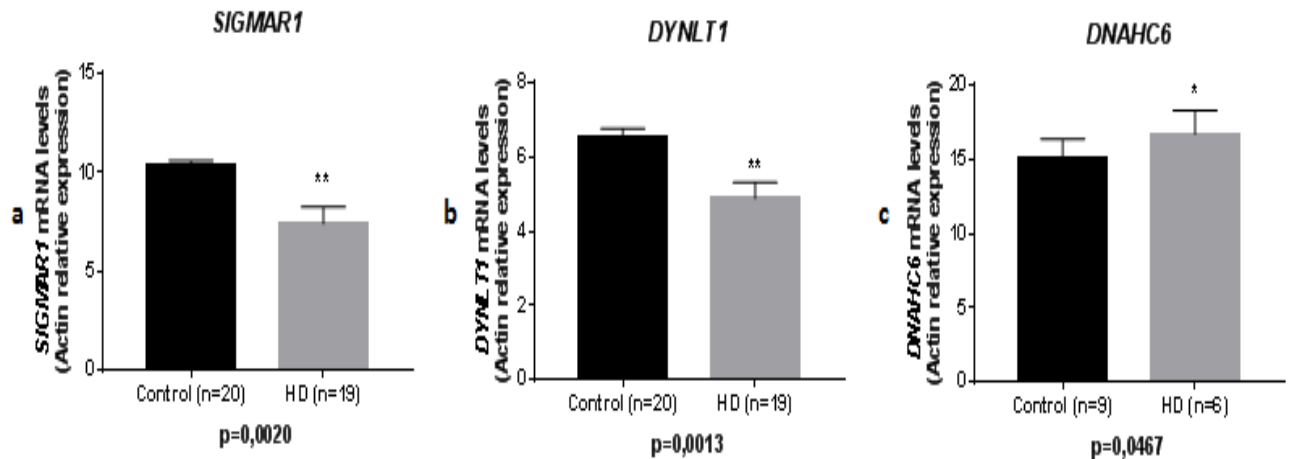


Fig. 12 Expression levels of genes *SIGMAR1*, *DYNLT1* and *DNAHC6* in the cellular blood of patients with HD quantified using qPCR. **a** Levels of *SIGMAR1* mRNA was significantly decreased in the cellular blood of patients with HD compared with age- and gender-matched controls. **b** *DYNLT1* mRNA levels was significantly decreased in the cellular blood of patients with HD compared with age- and gender-matched controls. **c** *DNAHC6* mRNA levels was significantly increase in the cellular blood of patients with HD compared with age- and gender-matched controls. Expression was normalized with β -actin control. Data were expressed as mean \pm S.E.M. *p 0.05, compared with the control

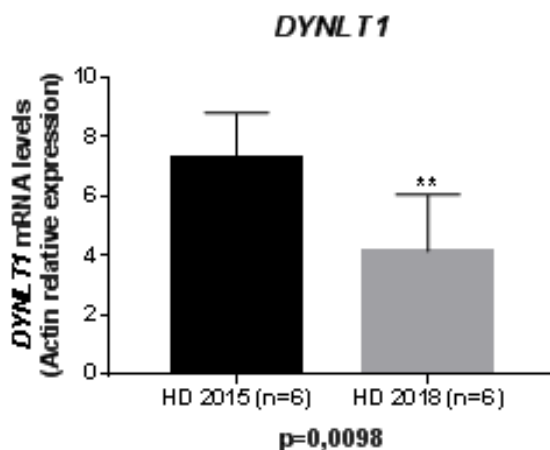


Fig. 13 Expression levels of gene *DYNLT1* in the cellular blood of patients with HD quantified using qPCR in different times and in the same patients.

Discussion

HD mutation is associated with mitochondrial dysfunction and apoptotic pathways. *SIGMAR1* regulate neurodegenerative diseases via direct or indirect regulation on mitochondria, especially via the mitochondrial associated endoplasmic reticulum membrane. *SIGMAR1* expression is decreased in mHtt protein expressing cells (HYRSKYLUOTO, et al., 2013; WENG, et al., 2017). A potential function for the *SIGMAR1* gene in the pathogenesis of HD has also emerged along with its potential as a target for disease modification (FEHÉR, et al., 2012).

In the present work, using a BACHD transgenic mice, we showed the same downregulation in the striatum of (4 months) mice compared to the *knock-in* mice (HdhQ111/Q111) used in our previous work (AREAL et al., 2017), these alterations are not observed in later stages of disease, suggesting that aging itself downregulates expression of *SIGMAR1*. These findings replicate by qPCR in the peripheral cellular blood of HD patients, corroborated with our previous data, and extend our earlier findings from genome-wide microarray studies, that is, *SIGMAR1* gene is decreased in HD and suggest this gene could be a useful peripheral blood marker in early stages of the HD and disease-modifying therapeutic targets.

Also, in the present study we showed that *DYNLT1* gene expression in whole blood of HD patients is significant downregulated and this difference is increased in later stages of disease (fig. 13). Our research group followed 6 of our 19 patients since 2015 and has stored data and samples, which enabled this analysis. No significant differences in mRNA levels of *DYNLT1* in BACHD were found compared to control mice.

In a previous study conducted by our research group (AREAL et al, 2017) using microarray analysis, as well as qPCR data, we showed that *DNAHC6* expression is decreased in HdhQ111/111 mice, as compared to control mice. Expression of *DNAHC6* gene was also decreased in HD patients when compared to control group. But in the present study, we did not observe significant differences in mRNA levels of *DNAHC6* in BACHD although there is

a significant increase in the cellular blood of patients with HD compared with controls.

Probably this difference could be explained once we are comparing different animal models and stages of the disease in HD patients and mice model. Because most of the patients are in the advanced stage of the disease according to UHDRS scale and Knock-in mice exhibit a very early onset phenotype of the disease whereas BACHD mice develop HD faster exhibiting progressive motor deficits and selective late-onset neurodegeneration in the cortex and striatum. Another hypothesis for the upregulation of RNA levels *DNAHC6* in HD patients is the possibility that mGluR5 expression is decreased in these patients. As we showed in a study by Ribeiro et al. (2014), HD animal models (HdhQ111/Q111/mGluR5^{-/-}) exhibited upregulation of RNA levels *DNAHC6* when the animal model had the mutation of the HD but did not have the mGluR5 metabotropic receptor.

The mGluR5 and the mutated huntingtin (mHtt) protein exhibit a functional interaction. The presence of mHtt is detrimental to many neuronal subtypes, but the medium spiny neurons (MSNs) are the main striatal neurons affected by the disease (ZUCCATO; CATTANEO, 2009). Selective excitotoxicity in this area, due to the high levels of glutamate receptors are hyperstimulated, which leads to excessive influx of calcium and results in the activation of apoptosis and cell death. Group I mGluR metabotropic receptors have also been described in neuronal cell death. Increasing evidence shows that mHtt alters mGluR signaling (RIBEIRO et al., 2011).

The BACHD mice exhibit a mHtt aggregation and a pattern of selective brain atrophy similar of that in adult HD patients (GRAY, et al., 2008). The BACHD mice show a stronger phenotype, compared to HdhQ111, which shows a very mild phenotype. *Knock-in* models representative for the pathophysiology of HD due to the genetic similarity in the animal model and HD patients, but they exhibit subtle behavioral and molecular abnormalities, which may precede more evident end-stage phenotypes (MENALLED, et al., 2009). In sum, both models are similar in several aspects to HD patients but the BACHD is more

representative to the profile of HD patients worked in this study because most are in the severe phase of the disease according to UHDRS scale (table 5).

Pcdh21 was downregulation only in BACHD mice model of HD in early (4 months), suggesting that aging itself downregulates expression of *Pcdh21* (KIM et al., 2011). This *Pcdh21* gene interacts with filaments of actin and other proteins causing macular dystrophy (Kleinman and Ambati, 2008). The color vision is significantly lower in patients with HD, the volume of the macula being decreased with the increase in HD severity. The retinal nerve fiber layer (RNFL) in the temporal region was identified as preferentially affected in HD, possibly implying mitochondrial dysfunction. In addition, the temporal RNFL thickness is reduced in patients with HD and is inversely correlated with disease duration (KERSTEN, et al., 2015).

There was no alteration in mRNA levels of *Lingo1* at 4 and 12 months. HD is characterized by late onset, therefore, reproducing the phenotype of human HD during the life of a mice represents a great challenge. However, mouse models are generally limited to the study of certain functional and behavioral measures (Fig. 4) (HERRMANN et al., 2012). Therefore, it is important to analyze the differences between the existing models, since no model can be considered superior to others in all aspects, and the use of more than one animal model should be considered, although the cost of screening also (MENALLED et al., 2009).

Gabra2 was significantly decreased in BACHD mice model of HD in early (4 months) stage of the disease. Here, we show the same downregulation in BACHD mice model in the late stage of HD (12 months), so this difference it is even higher in later stages of the disease, suggesting these changes may correlate with progression. The *Gabra2* receptor shows almost total loss of receptors in the caudate nucleus and putamen in the more advanced HD stages. An increase in the *Gabra2* receptor in the striatum is uncommon, and may represent the onset of dysfunction of the middle spiny neurons, in the absence of any visible degeneration (GLASS, et al., 2000; GLASS et al., 2004).

Conclusions

The present study shows that the presence of mutant huntingtin causes decreased expression levels of *Sigmar1* gene in HD patients and in BACHD mice, also, in *DYNLT1* gene expression in whole blood of HD patients is significant downregulated and this difference is increased in later stages of disease. However, more studies are necessary to clearly understand the precise molecular mechanism of downregulation of this gene in HD pathogenesis, and to further validate its potential for providing novel biomarkers and disease-modifying therapeutic targets for HD. Levels of mGluR5 expression should be tested in these patients to verify the reason of the altered expression of *DNAHC6*. Continued studies are necessary for the *Pcdh21* and *Gabra2* genes in humans since these genes have been altered in the animal model, as well as to be investigated the *Lingo1* gene in humans and in other animal models of HD. In conclusion, the genes *Sigmar1* and *DNYLT1* could usefully markers and also targets for potential treatments in the future for HD.

Acknowledgments

The authors thank the Health Sciences Center facility Laboratório de Análises Biomoleculares (LABIOM) for the support with molecular analysis. We are grateful to the laboratory Hermes Pardini, for molecular diagnosis, and the Universidade Federal de Minas Gerais, for provide the BACHD animal model.

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES) grants to DAMG, FAPES/CNPq/MS-Decit/SESA – PPSUS (edital nº 10/2013), process 65823648/2014.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

ALLEN, K. L.; WALDVOGEL, H. J.; GLASS, M.; FAULL, R. L. M. (2009). Cannabinoid (CB1), GABAA and GABAB receptor subunit changes in the globus pallidus in Huntington's disease. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 37, p. 266–281.

ANDERSON, T. J.; MACASKILL, M. R. (2013). Eye movements in patients with neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurol.* 9, p. 74–85.

AREAL, L. B.; PEREIRA, L. P.; RIBEIRO, F. M.; OLMO, I. G.; MUNIZ, M. R.; RODRIGUES, M. C.; COSTA, P. F.; MARTINS-SILVA, C.; FERGUSON, S. S. G.; GUIMARÃES, D. A. M.; PIRES, R. G. W. (2017). Role of Dynein Axonemal Heavy Chain 6 Gene Expression as a Possible Biomarker for Huntington's Disease: a Translational Study. *J Mol Neurosci.*

ARONIN, N.; CHASE, K.; YOUNG, C.; SAPP, E.; SCHWARZ, C.; MATTA, N.; KORNREICH, R.; LANDWEHRMEYER, B.; BIRD, E.; BEAL, M. F.; VONSATTEL, J. P.; SMITH, T.; CARRAWAY, R.; BOYCE, F. M.; YOUNG, A. B.; PENNEY, J. B.; DIFIGLIA, M. (1995). CAG Expansion Affects the Expression of Mutant Huntingtin in the Huntington's Disease Brain. *Cell Press.*

BHATTACHARYYA, N. P.; BANERJEE, M.; MAJUMDER, P. (2008). Huntington's disease: roles of huntingtin-interacting protein 1 (HIP-1) and its molecular partner HIPPI in the regulation of apoptosis and transcription. *FEBS Journal*, p. 4271–4279.

BROCKLEBANK D., GAYÁN J., ANDRESEN J. M., ROBERTS, S. A.; THE INTERNATIONAL-VENEZUELA COLLABORATIVE RESEARCH GROUP; YOUNG, A. B.; SNODGRASS, S. R.; PENNEY, J. B.; RAMOS-ARROYO, M. A.; CHA, J. J.; ROSAS, H. D.; HERSCH, S. M.; FEIGIN, A.; CHERNY, S. S.; WEXLER, N. S.; HOUSMAN, D. E.; CARDON, L. R. (2008). Repeat instability in the 27–39 CAG range of the HD gene in the Venezuelan kindreds: counseling implications. *Am J Med Genet Part B*, v. 150B, p. 425–429.

CARROL, J. B.; BATES, G. P.; STEFFAN, J.; SAFT, C.; TABRIZI, S. J. (2015).

Treating the whole body in Huntington's disease. *Lancet Neurol*, v. 14, p. 1135-1142.

CASTILHOS, R. M.; AUGUSTIN, M. C.; SANTOS, J. A.; PERANDONES, C.; SARAIVA-PEREIRA, M. L.; JARDIM, L. B. (2016). Genetic aspects of Huntington's disease in Latin America. A systematic review. *Clinical genetics*.

CATTANEO, E; ZUCCATO, C; TARTARI, M. (2005). Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci*, v. 6, n. 12, p. 919-930.

CHEN, X. J.; XU, H.; COOPER, H. M.; LIU, Y. (2014). Cytoplasmic dynein: a key player in neurodegenerative and neurodevelopmental diseases. *Sci China Life Sci*.

CORREALE, J.; GAITÁN, M., I.; YSRRAELIT, M., C.; FIOL, M., P. Progressive multiple sclerosis: from pathogenic mechanisms to treatment. (2016). *A journal of neurology*.

CROOK, Z. R.; HOUSMAN, D. (2011). *Huntington's Disease: Can Mice Lead the Way to Treatment?* Cell Press.

DIFIGLIA, M.; SAPP, E.; CHASE, K.; SCHWARZ, C.; MELONI, A.; YOUNG, C.; MARTIN, E.; VONSATTEL, J. P.; CARRAWAY, R.; REEVES, S, A.; BOYCE, F. M.; ARONIN, N. (1995). Huntingtin Is a Cytoplasmic Protein Associated with Vesicles in Human and Rat Brain Neurons. *Cell Press*.

FEHERA, A.; JUHASZA, A.; LASZLOB, A.; KALMAN Jr., J.; PAKASKIA, M.; KALMANA, J.; JANKAA, Z. (2012). Association between a variant of the sigma-1 receptor gene and Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, p. 136– 139.

EHRNHOFER, D. E.; BUTLAND, S. L.; POULADI, M. A.; HAYDEN, M. R. (2009). Mouse models of Huntington disease: variations on a theme. *Disease Models & Mechanisms*, p. 123-129.

GERVAIS, F. G.; SINGARAJA, R.; XANTHOUDAKIS, S.; GUTEKUNST, C. A.; LEAVITT, B. R.; METZLER, M.; HACKAM, A. S.; TAM, J.; VAILLANCOURT, J.

P.; HOUTZAGER, V.; RASPER, D. M., ROY, S.; HAYDEN, M. R.; NICHOLSON, D. W. (2002). Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hippi. *Nature Cell Biol*, v. 4, p. 95-105.

GLASS, M.; DRAGUNOW, M.; FAULL, R. L. M. (2000). THE PATTERN OF NEURODEGENERATION IN HUNTINGTON'S DISEASE: A COMPARATIVE STUDY OF CANNABINOID, DOPAMINE, ADENOSINE AND GABAA RECEPTOR ALTERATIONS IN THE HUMAN BASAL GANGLIA IN HUNTINGTON'S DISEASE. *Neuroscience*, vol. 97, No. 3, p. 505–519.

GLASS, M.; VAN DELLEN, A.; BLAKEMORE, C.; HANNAN, A. J.; FAULL, R. L. M. (2004). DELAYED ONSET OF HUNTINGTON'S DISEASE IN MICE IN AN ENRICHED ENVIRONMENT CORRELATES WITH DELAYED LOSS OF CANNABINOID CB1 RECEPTORS. *Neuroscience* 123, p. 207–212.

GONÇALVES, N. F. C. (2013). DOENÇA DE HUNTINGTON: UMA REVISÃO. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Universidade da Beira Interior, Ciência da Saúde, Covilhã.

GRAY, M.; SHIRASAKI, D. I.; CEPEDA, C.; ANDRE, V. M.; WILBURN, V.; LU, X. H.; TAO, J.; YAMAZAKI, I.; LI, S. H.; SUN, Y. E.; LI, X. J.; LEVINE, M. S.; YANG, X. W. (2008). Full Length Human Mutant Huntingtin with a Stable Polyglutamine Repeat Can Elicit Progressive and Selective Neuropathogenesis in BACHD Mice. *J Neurosci*, p. 6182–6195.

HELMLINGER, D.; YVERT, G.; PICAUD, S.; MERIENNE, K.; SAHEL, J.; MANDEL, J. L.; DEVYS, D. (2002). Progressive retinal degeneration and dysfunction in R6 Huntington's disease mice. Oxford University Press. *Human Molecular Genetics*, vol. 11, No. 26, p. 3351–3359.

HERRMANN, K. H.; SCHMIDT, S.; KRETZ, A.; HAENOLD, R.; KRUMBEIN, I.; METZLER, M.; GASER, C.; WITTE, O. W.; REICHENBACH, J. R. (2012). Possibilities and limitations for high resolution small animal MRI on a clinical whole-body 3T scanner. *Magn Reson Mater Phy*.

HUNTINGTON STUDY GROUP. (1996). Unified Huntington's Disease Rating Scale: Reliability and Consistency. *Movement Disorder Society*, v. 11, No. 2, p. 136-142.

JANUÁRIO, C. (2011). *Doença de Huntington: onde estamos agora?* Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina - Universidade de Coimbra, Coimbra.

JIANG, Y.; CHADWICK, S. R.; LAJOIE, P. (2015). Endoplasmic reticulum stress: The cause and solution to Huntington's disease? *Brain Research, Review*.

KERSTEN, H. M.; DANESH-MEYER, H. V.; KILFOYLE, D. H.; ROXBURGH, R. H. (2015). Optical coherence tomography findings in Huntington's disease: a potential biomarker of disease progression. *J Neurol*, p. 2457–2465.

KIM, S. Y.; YASUDA, S.; TANAKA, H.; YAMAGATA, K.; KIM, H. (2011). Non-clustered protocadherin. *Cell Adhesion & Migration*, p. 97-105.

KLEIM, J. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *TRENDS in Molecular Medicine*, v.8, No.6.

KLEINMAN, M. E.; AMBATI, J. (2008). Fifty years later: the disk goes to the prom. *The journal of Clinical Investigation*.

KLEMPÍR, J.; KLEMPÍROVÁ, O.; SPACKOVÁ, N.; ZIDOVSKÁ, J.; ROTH, J. (2006). Unified Huntington's disease rating scale: clinical practice and a critical approach. *Funct Neurol*, v.4, p. 217-221.

KREMER, B.; ALMQVIST, E.; THEILMANN, J.; SPENCE, N.; TELENIUS, H.; GOLDBERG, Y. P.; HAYDEN, M. R. (1995). Sex-Dependent Mechanisms For Expansions and Contractions of the CAG Repeat on Affected Huntington Disease Chromosomes. *Am J Hum Genet*.

LEIGH, R. J.; NEWMAN, S. A.; FOLSTEIN, S. E.; LASKER, A. G.; JENSEN, B. A. (1983). Abnormal ocular motor control in Huntington's disease. *Neurology*.

LYE, R. J.; et al. (1987). Identification of a microtubulebased cytoplasmic motor in the nematode *C. elegans*. *Cell*, v. 51, p. 309-318.

MACDONALD, M. E.; GINES, S.; GUSELLA, J. F.; WHEELER, V. C. (2003). Huntington's Disease. *NeuroMolecular Medicine*, V. 4.

MATTSON, M. P. (2002). Accomplices to neuronal death. *Huntington's disease*. Macmillan Magazines Ltd, *NATURE* vol. 415.

MELO, T.Q; D'UNHAO, A. M.; MARTINS, S. A.; FARIZATTO, K. L. G.; CHAVES, R. S.; FERRARI, M. F. R. (2013). Rotenone-Dependent Changes of Anterograde Motor Protein Expression and Mitochondrial Mobility in Brain Areas Related to Neurodegenerative Diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 33, n. 3, p. 327-335.

MENALLED, L. B.; SISON, J. B.; WU, Y.; OLIVIERI, M.; LI, X. J.; LI, H.; ZEITLIN, S.; CHESSELET, M. F. (2002). Early Motor Dysfunction and Striosomal Distribution of Huntingtin Microaggregates in Huntington's Disease Knock-In Mice. *The Journal of Neuroscience*.

MENALLED, L.; EL-KHODOR, B., F.; PATRY, M.; SUAREZ-FARINAS, M.; ORENSTEIN, S.; ZAHASKY, B; LEAHY, C.; WHEELER, V.; YANG, X., W.; MACDONALD, M.; MORTON, J., A.; BATES, G.; LEEDS, J.; PARK, L.; HOWLAND, D.; SIGNER, E.; TOBIN, A.; BRUNNER, D. (2009). Systematic behavioral evaluation of Huntington's disease transgenic and knock-in mouse models. *Neurobiol Disease*, v. 35, n.3, p. 319–336.

MI, S.; SANDROCK, A.; MILLER, R. H. (2008). LINGO-1 and its role in CNS repair. *Medicine in focus. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, p. 1971-1978.

MI, S.; PEPINSKY, R. B.; CADAVID, D. (2013). Blocking LINGO-1 as a Therapy to Promote CNS Repair: From Concept to the Clinic. *Department of Discovery Neurobiology*.

MUNOZ-SANJUAN, I.; BATES, G. P. (2011). The importance of integrating basic and clinical research toward the development of new therapies for Huntington disease. *The Journal of Clinical Investigation*, n. 2.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. S. (2010). Real time PCR and RT-PCR technology and its applications in the medicine field. *Faculdade de Medicina do ABC*, v. 67, p. 7-19.

NGUYEN, L.; LUCKE-WOLD, B. P.; MOOKERJEE, S. A.; CAVENDISH, J. Z.; ROBSON, M. J.; SCANDINARO, A. L.; Matsumoto, R. R. (2015). Role of sigma-1 receptors in neurodegenerative diseases. *Journal of Pharmacological Sciences*, p. 17 - 29.

ORR, A. L.; LI, S.; WANG, C. E.; LI, H.; WANG, J.; RONG, J.; XU, X.; MASTROBERARDINO, P. G.; GREENAMYRE, T.; LI, X. J.. (2008). N-terminais associados huntingtina mutantes com mitocôndrias e prejudica o tráfico mitocondrial. *J. Neurosci*, v. 28, p. 2783-2792.

PASCHAL, B. M; SHPETNER, H. S; VALLEE, R. B. (1987). MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. *J Cell Biol*, v.105, p.1273-1282.

POULADI, M. A.; BEZPROZVANNY, I.; RAYMOND, L. A.; HAYDEN, M. R. (2006). Molecular pathogenesis of Huntington's Disease: The role of excitotoxicity. *Genetic Instabilities and Neurological Diseases*, c. 15.

QUARRELL, O.; O'DONOVAN, K. L.; BANDMANN, O.; STRONG, M. (2012). The Prevalence of Juvenile Huntington's Disease: A Review of the Literature and Meta-Analysis. *PLOS Currents Huntington Disease*.

RAWLINS, M. D.; WEXLER, N. S.; WEXLER, A. R.; TABRIZI, S. J.; DOUGLAS, I.; EVANS, S. J. W.; SMEETH, L. (2016). The Prevalence of Huntington's Disease. *Neuro Epidemiology, Systematic Review*.

RIBEIRO, F. M.; PIRES, R. G. W.; FERGUSON, S. S. G. (2011). Huntington's Disease and Group I Metabotropic Glutamate Receptors. *Molecular Neurobiology*, v. 43, p. 1–11.

RIBEIRO, F. M.; DEVRIES, R. A.; HAMILTON, A.; GUIMARÃES, I. M.; CREGAN, S. P.; PIRES, R. G. W.; FERGUSON, S. S. G. (2014). Metabotropic glutamate receptor 5 knockout promotes motor and biochemical alterations in a

mouse model of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, v. 23, p. 2030-2042.

ROOS, R. A. C. (2010). Huntington's disease: a clinical review *Orphanet Journal of Rare Diseases*.

ROSS, C. A.; TABRIZI, S. J. (2011). Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neural, Review*, V. 10, p. 83-98.

RÜB, U.; SEIDEL, K.; HEINSEN, H.; VONSATTEL, J. P.; DEN DUNNEN, W. F.; KORF, H. W. (2016a). Huntington's disease (HD): The neuropathology of a multisystem neurodegenerative disorder of the human brain. *Brain Pathology Journal*, p. 5.

RÜB, U.; VONSATTEL, J. P.; HEINSEN, H.; KORF, H. W. (2016b). The Neuropathology of Huntington's Disease: Classical Findings, Recent Developments and Correlation to Functional Neuroanatomy. *Brain Pathology Journal*.

SCHAUWECKER, P. E. (2005). Susceptibility to excitotoxic and metabolic striatal neurodegeneration in the mouse is genotype dependent. *Brain Research*, p.112-120.

SEMAKA, A.; CREIGHTON, S.; WARBY, S.; HAYDEN, M. R. (2006). Predictive testing for Huntington disease: interpretation and significance of intermediate alleles. *Clin Genet*.

SHARP, A. H.; LOEV, S. J.; SCHILLING, G.; LI, S. H.; LI, X. J.; BAO, J.; WAGSTER, M.V.; KOTZUK, J. A.; STEINER, J. P.; LO, A.; HEDREEN, J.; SISODIA, S.; SNYDER, S. H.; DAWSON, T. M.; RYUGO, D. K.; ROSS, C. A. (1995). Widespread Expression of Huntington's Disease Gene (IT15) Protein Product. *Cell Press*.

SHELBOURNE, P. F.; KILLEEN, N.; HEVNER, R. F.; JOHNSTON, H. M.; TECOTT, L.; LEWANDOSKI, M.; ENNIS, M.; RAMIREZ, L.; LI, Z.; IANNICOLA, C.; LITTMAN, D. R.; MYERS, R. M. (1999). A Huntington's disease CAG

expansion at the murine Hdh locus is unstable and associated with behavioural abnormalities in mice. *Human Molecular Genetics*, vol. 8, n. 5.

SQUITIERI, F.; GELLERA, C.; CANNELLA, M.; MARIOTTI, C.; CISLAGHI, G.; RUBINSZT Homozygosity for CAG mutation in HunIN, D. C.; ALMQVIST, E. W.; TURNER, D.; BACHOUD-LÉVI, A. C.; SIMPSON, S. A.; DELATYCKI, M.; MAGLIONE, V.; HAYDEN, M. R.; DI DONATO, S. (2003). Huntington disease is associated with a more severe clinical course. *Brain*, v. 126, n. 4, p. 946-955.

THE U.S.-VENEZUELA COLLABORATIVE RESEARCH PROJECT, WEXLER, N.S.; HOUSMAN, D. E. Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. (2004). *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 101 (10), p. 3498–3503.

THsDCRG: The Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72: 971–983.

VALLEE, R. B., WILLIAMS, J. C.; VARMA, D.; BARNHART, L. E. (2004). Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J Neurobiol*, v. 58, p. 189-200.

VAZ, I. P.; PAIVA, C. L. A. (2016). Notification of Huntington's disease as primary cause of death in Brazil from 1984 to 2008. *Genetic and Molecular Research*.

VIEREGGE, P. (2007). Chorea. *Therapeutische Umschau*.

VONSATTEL, J. P.G.; DIFIGLIA, M. (1998). Huntington Disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*.

WALKER, F. O. (2007). Huntington's disease. *Lancet*, 369: 218–28.

WENG, T. Y.; TSAI, S. Y. A.; SU, T., P. (2017). Roles of sigma-1 receptors on mitochondrial functions relevant to neurodegenerative diseases. *Journal of Biomedical Science*.

YU-TAEGER, L.; PETRASCH-PARWEZ, E.; OSMAND, A. P.; REDENSEK, A.; METZGER, S.; CLEMENS, L. E.; PARK, L.; HOWLAND, D.; CALAMINUS, C.; GU, X.; PICHLER, B.; YANG, X. W.; RIESS, O.; NGUYEN, H. P. (2012). A Novel BACHD Transgenic Rat Exhibits Characteristic Neuropathological Features of Huntington Disease. *Neurobiology of Disease. The Journal of Neuroscience*.

ZUCCATO, C.; CATTANEO, E. (2009). Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases, *Nat. Rev. Neurol.* 5, 311-322.

APÊNDICE 1

UFES - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO ESPÍRITO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação da expressão dos genes DNAHC6, Pcdh21, Sigmart1, Lingo1 2 Gabra2 como marcadores moleculares na Doença de Huntington

Pesquisador: Daniela Amorim Melgaço Guimarães do Bem

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 2

CAAE: 62650116.6.0000.5060

Instituição Proponente: Centro de Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.621.722

APÊNDICE 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - PACIENTES

O(A) Sr.(a) _____ foi convidado (a) a participar da pesquisa intitulada: "AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DNAH6, PCDH21, SIGMAR1, LINGO1 E GABRA2 COMO MARCADORES MOLECULARES NA DOENÇA DE HUNTINGTON", sob a responsabilidade das Professoras Dr^{as}. DANIELA AMORIM M. GUIMARÃES DO BEM e Dr^a. RITA GOMES WANDERLEY PIRES, e SUELLEN ROSSATO MENDONÇA (pesquisadora/mestranda).

JUSTIFICATIVA

A DH é a causa genética mais comum de movimentos involuntários anormais. No entanto, estudos sobre a DH ainda são muito escassos na literatura. Dessa forma, esta pesquisa pretende colaborar com os avanços no conhecimento desta doença, os quais irão contribuir para o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas que possam efetivamente tratar a doença de forma mais específica e precoce, pois quanto mais cedo o diagnóstico molecular das primeiras alterações celulares que antecedem as manifestações clínicas da DH for identificado, o tratamento pode atuar por mais tempo, proporcionando uma melhora na qualidade de vida do paciente e de seus familiares.

OBJETIVO(S) DA PESQUISA

Determinar se as alterações na expressão gênica observadas em modelo animal geneticamente modificado para DH podem ser marcadores moleculares em pacientes e familiares. Avaliar o estágio clínico dos portadores de DH através da Escala Unificada para avaliação da Doença de Huntington (UHDRS) para correlacionar com o diagnóstico molecular no presente estudo; correlacionar o padrão de expressão do gene DNAH6 em diferentes tempos em pacientes com DH; investigar se outros possíveis genes alterados em modelo animal de DH (Pcdh21, Sigmar1, Lingo1 e Gabra2), apresentam as mesmas alterações moleculares em humanos portadores de DH e avaliar a expressão dos genes DNAH6, Pcdh21, Sigmar1, Lingo1 e Gabra2 em familiares de pacientes com DH sem diagnóstico, como um possível marcador sanguíneo para as primeiras alterações celulares que antecedem as manifestações clínicas da DH.

PROCEDIMENTOS

Este estudo necessita de amostras de sangue venoso e, por isso, é solicitado ao (a) Sr.(a) a permissão para colher aproximadamente 12 mL de sangue e caso o Sr.(a) concorde, a permissão para guardar o sangue restante para estudos futuros. Esse material será cuidadosamente armazenado em tubos de plástico, acondicionados dentro de caixas identificadas por códigos, que serão mantidas em freezer -80°C, por um período de 10 anos constituindo um biorepositório já aprovado pelo departamento de Ciências Farmacêuticas da UFES. É solicitado ainda permissão para coletar dados clínicos e laboratoriais que constem em prontuário médico.

DURAÇÃO E LOCAL DA PESQUISA

Os procedimentos serão realizados em local apropriado para coleta de sangue do próprio Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes da UFES (HUCAM/UFES), Vitória (ES). A coleta de amostra será realizada em dois momentos durante o período de consultas regulares, não havendo necessidade de o paciente retornar ao HUCAM para apenas atender a finalidade do estudo.

RUBRICAS

RISCOS E DESCONFORTOS

A coleta de amostras de sangue venoso pode ocasionar pequena dor e desconforto com a picada da agulha ou ainda extravasamento sanguíneo subcutâneo sem gravidade, que pode resultar em leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Existe ainda o risco de contaminações. Para minimizar o risco de contaminações e formação de hematomas, a coleta de sangue será realizada por um profissional com experiência e capacidade técnica do próprio HUCAM com material estéril e da melhor qualidade.

BENEFÍCIOS

Com a sua colaboração poderemos entender melhor as características da sua doença podendo contribuir desta forma na melhora da terapia e qualidade de vida.

ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA

Durante e após o término dos trabalhos de pesquisa, o(a) Sr(a) será devidamente acompanhado(a) pelos médicos que estão cuidando do Sr (a) e terá a garantia de receber o esclarecimento de qualquer dúvida e informações sobre este estudo.

GARANTIA DE RECUSA EM PARTICIPAR DA PESQUISA E/OU RETIRADA DE CONSENTIMENTO

O(A) Sr(a) não é obrigado(a) a participar da pesquisa, podendo deixar de participar dela em qualquer momento de sua execução, sem que haja penalidades ou prejuízos decorrentes de sua recusa. Caso decida retirar seu consentimento, o(a) Sr(a) não mais será contatado(a) pelos pesquisadores.

GARANTIA DE MANUTENÇÃO DO SIGILO E PRIVACIDADE

Os pesquisadores se comprometem a resguardar sua identidade durante todas as fases da pesquisa, inclusive após publicação.

GARANTIA DE RESSARCIMENTO FINANCEIRO

Os pacientes envolvidos no estudo não terão nenhum gasto caso aceitem participar, visto que o material utilizado na coleta de sangue será custeado pelo pesquisador responsável. O momento da coleta será durante a consulta de rotina do paciente no HUCAM não havendo necessidade do paciente se deslocar para o local apenas para a coleta.

GARANTIA DE INDENIZAÇÃO

De acordo com o Item 64.0 da Resolução CNS 466/12, o Sr(a) apresenta direito de indenização mediante decisão judicial, caso haja eventuais danos decorrentes da pesquisa.

ESCLARECIMENTO DE DÚVIDAS

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa ou para relatar algum problema, o(a) Sr(a) pode contatar a pesquisadora DANIELA AMORIM M. GUIMARÃES DO BEM no telefone 3335 7556, ou no endereço Avenida Marechal Campos, nº 1468, Departamento de Ciências Farmacêuticas,

RUBRICAS

Centro de Ciências da Saúde, Campus Maruípe, Universidade Federal do Espírito Santo, Maruípe, Vitória, ES. Q(A) Sr.(a) também pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (CEP/CCS/UFES) através do telefone (27) 3335-7211, e-mail cep.ufes@hotmail.com ou correio: Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, Prédio Administrativo do CCS, Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, CEP 29.040-090, Vitória - ES, Brasil. O CEP/CCS/UFES tem a função de analisar projetos de pesquisa visando à proteção dos participantes dentro de padrões éticos nacionais e internacionais. Seu horário de funcionamento é de segunda a sexta-feira, das 8h às 14h.

Declaro que fui verbalmente informado e esclarecido sobre o presente documento, entendendo todos os termos acima expostos, e que voluntariamente aceito participar deste estudo. Também declaro ter recebido uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de igual teor, assinada pela(s) pesquisador(a) principal ou seu representante, rubricada em todas as páginas.

Vitória, _____ de _____ de _____.

Participante da pesquisa/Responsável legal

Na qualidade de pesquisadora responsável pela pesquisa "AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENE8 DNAH8, PCDH21, SIGMAR1, LINGO1 E GABRA2 COMO MARCADORE8 MOLECULARE8 NA DOENÇA DE HUNTINGTON", eu, SUELLEN ROSETO MENDONÇA, declaro ter cumprido as exigências do(s) item(s) III.3 e IV.4 (se pertinente), da Resolução CNS 466/12, a qual estabelece diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

Pesquisadora

RUBRICAS

APÊNDICE 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - CONTROLES

O(A) Sr.(a) _____ foi convidado (a) a participar da pesquisa intitulada "AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DNAHC6, PCDH21, SIGMAR1, LINGO1 E GABRA2 COMO MARCADORES MOLECULARES NA DOENÇA DE HUNTINGTON", sob a responsabilidade das Professoras Dr^{as}. DANIELA AMORIM M. GUIMARÃES DO BEM e Dr^a. RITA GOMES WANDERLEY, e SUELLEN ROSSETO MENDONÇA (pesquisadora/mestranda).

JUSTIFICATIVA

A DH é a causa genética mais comum de movimentos involuntários arritmicos. No entanto, estudos sobre a DH ainda são muito escassos na literatura. Dessa forma, esta pesquisa pretende colaborar com os avanços no conhecimento desta doença, os quais irão contribuir para o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas que possam efetivamente tratar a doença de forma mais específica e precoce, pois quanto mais cedo o diagnóstico molecular das primeiras alterações celulares que antecedem as manifestações clínicas da DH for identificado, o tratamento pode atuar por mais tempo, proporcionando uma melhoria na qualidade de vida do paciente e de seus familiares.

OBJETIVO(S) DA PESQUISA

Determinar se as alterações na expressão gênica observadas em modelo animal geneticamente modificado para DH podem ser marcadores moleculares em pacientes e familiares. Avaliar o estágio clínico dos portadores de DH através da Escala Unificada para avaliação da Doença de Huntington (UHDRS) para correlacionar com o diagnóstico molecular no presente estudo; correlacionar o padrão de expressão do gene DNAHC6 em diferentes tempos em pacientes com DH; investigar se outros possíveis genes alterados em modelo animal de DH (Pcdh21, Sigmar1, Lingo1 e Gabra2), apresentam as mesmas alterações moleculares em humanos portadores de DH e avaliar a expressão dos genes DNAHC6, Pcdh21, Sigmar1, Lingo1 e Gabra2 em familiares de pacientes com DH sem diagnóstico, como um possível marcador sanguíneo para as primeiras alterações celulares que antecedem as manifestações clínicas da DH.

PROCEDIMENTOS

Este estudo necessita de amostras de sangue venoso e, por isso, é solicitado ao (à) Sr.(a) a permissão para colher 12 mL de sangue. Esse material será cuidadosamente armazenado em tubos de plástico, acondicionados dentro de caixas identificadas por códigos, que serão mantidas em freezer -80°C, por um período máximo de até 10 anos constituindo um biorrepositório já aprovado pelo departamento de Ciências Farmacêuticas da UFES. É solicitado ainda permissão para coletar dados clínicos e laboratoriais que constem em prontuário médico. Caso o Sr.(a) concorde, solicitamos a permissão para guardar o sangue restante para estudos futuros. As amostras armazenadas podem ser utilizadas em novas pesquisas desde que aprovadas pelo CEP.

DURAÇÃO E LOCAL DA PESQUISA

Os procedimentos de coleta de sangue serão realizados pela equipe de coletores do HUCAM, uma vez que o Sr.(a) já se encontra à espera da coleta para outros exames. A coleta da amostra será realizada em dois momentos (início e após 6 meses) um momento pré-agendado, não havendo

RUBRICAS

necessidade do paciente retornar ao laboratório do HUCAM apenas para atender a finalidade do estudo.

RISCOS E DESCONFORTOS

Os possíveis riscos aos quais os sujeitos da pesquisa estarão expostos são risco de divulgação de dados privativos dos voluntários, o que será anulado, pois apenas o pesquisador terá acesso aos dados e o mesmo ratifica sua confidencialidade pelo Termo de Sigilo. O risco biológico de acidente de punção durante a coleta de sangue venoso será minimizado pela coleta de sangue realizada por um profissional com experiência, capacidade técnica e em local com infraestrutura adequada para este procedimento. Cabe ressaltar que o Sr(a) já se encontra à espera da coleta para outros exames.

BENEFÍCIOS

Os benefícios são indiretos. As informações coletadas servirão para um melhor entendimento das características da DH e de possíveis novos marcadores moleculares de prognóstico.

ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA

Durante a coleta o(a) Sr.(a) será devidamente acompanhado(a) pelos profissionais que estão cuidando do Sr (a) no momento da coleta de sangue. Caso haja alguma complicação durante o procedimento, o Sr (a) será prontamente atendido. Durante e após os procedimentos terá a garantia de receber o esclarecimento de qualquer dúvida e informações que possa ter sobre este estudo.

GARANTIA DE RECUSA EM PARTICIPAR DA PESQUISA E/OU RETIRADA DE CONSENTIMENTO

O(A) Sr.(a) não é obrigado(a) a participar da pesquisa, podendo deixar de participar dela em qualquer momento de sua execução, sem que haja penalidades ou prejuízos decorrentes de sua recusa. Caso decida retirar seu consentimento, o(a) Sr.(a) não mais será contatado(a) pelos pesquisadores.

GARANTIA DE MANUTENÇÃO DO SIGILO E PRIVACIDADE

Os pesquisadores se comprometem a resguardar sua identidade durante todas as fases da pesquisa, inclusive após publicação.

GARANTIA DE RESSARCIMENTO FINANCEIRO

Os pacientes envolvidos no estudo não terão nenhum gasto caso aceitem participar, visto que o material utilizado na coleta de sangue será custeado pelo pesquisador responsável. O momento da coleta será durante a presença do indivíduo na fila do laboratório de análises clínicas do HUCAM, não havendo necessidade do paciente se deslocar para o local apenas para a coleta.

GARANTIA DE INDENIZAÇÃO

O Sr.(a) apresenta direito de indenização caso haja eventuais danos decorrentes da pesquisa, garantido pelos pesquisadores responsáveis.

RUBRICAS

ESCLARECIMENTO DE DÚVIDAS

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa ou para relatar algum problema, o(a) Sr.(a) pode contatar a pesquisadora DANIELA AMORIM M. GUIMARÃES DO BEM no telefone 3335 7556, ou no endereço Avenida Marechal Campos, nº 1468, Departamento de Ciências Farmacéuticas, Centro de Ciências da Saúde, Campus Marulpe, Universidade Federal do Espírito Santo, Marulpe, Vitória, ES. O(a) Sr.(a) também pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (CEPICCS/UFES) através do telefone (27) 3335-7211, e-mail cep.ufes@hotmail.com ou correio: Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, Prédio Administrativo do CCS, Av. Marechal Campos, 1468, Marulpe, CEP 29.040-090, Vitória - ES, Brasil. O CEPICCS/UFES tem a função de analisar projetos de pesquisa visando à proteção dos participantes dentro de padrões éticos nacionais e internacionais. Seu horário de funcionamento é de segunda a sexta-feira, das 8h às 14h.

Declaro que fui verbalmente informado e esclarecido sobre o presente documento, entendendo todos os termos acima expostos, e que voluntariamente aceito participar deste estudo. Também declaro ter recebido uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de igual teor, assinada pelo(a) pesquisador(a) principal ou seu representante, rubricada em todas as páginas.

Vitória, ____ de _____ de _____.

Participante da pesquisa/Responsável legal

Na qualidade de pesquisadora responsável pela pesquisa "AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENE\$ DNAH6\$, PCDH21, SIGMAR1, LINGO1 E GABRA2 COMO MARCADORES MOLECULARES NA DOENÇA DE HUNTINGTON", eu, SUELLEN ROSSETO MENDONÇA, declaro ter cumprido as exigências do(s) item(s) IV.3 e IV.4 (se pertinente), da Resolução CNS 66/12, a qual estabelece diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

Pesquisadora

RUBRICAS

ANEXO 1

**Escala Unificada para avaliação da Doença de Huntington – UHDRS
(Huntington Study Group,1996)**

<u>AVALIAÇÃO MOTORA</u>	
<p>1-SEGUIMENTO OCULAR 0- completo (normal) 1- movimento com abalos 2- seguimento com interrupções/amplitude completa 3- amplitude incompleta 4- incapaz de perseguir</p>	
<p>2-INÍCIO DO MOVIMENTO SACÁDICO 0- normal 1- somente aumento na latência 2- piscamentos suprimíveis ou movimentos de cabeça ao iniciar o movimento 3- movimentos de cabeça não-suprimíveis 4- não consegue iniciar os movimentos sacádicos</p>	
<p>3-VELOCIDADE DO MOVIMENTO SACÁDICO 0- normal 1- leve alentecimento 2- moderado alentecimento 3- grave alentecimento, amplitude normal 4- amplitude incompleta</p>	
<p>4-DISARTRIA 0- normal 1- fala pouco clara, mas não precisa repetir 2- precisa repetir para ser compreendido 3- a maior parte da fala é incompreensível 4- mudo</p>	
<p>5-PROTUSÃO DA LÍNGUA 0- pode protruir a língua completamente por 10 segundos 1- não pode protruir a língua completamente por 10 segundos 2- não pode protruir a língua completamente por 5 segundos 3- incapaz de protruir a língua completamente 4- não pode protruir a língua além dos lábios</p>	
<p>6-BATIDA DOS DEDOS MSD MSE 0- normal (\geq 15/ 5segundos) 1- leve alentecimento ou redução o na amplitude (11-14/ 5s) 2- moderado alentecimento, fadiga precoce nítida, pode ter interrupções ocasionais dos movimentos (7-10/ 5s) 3- acentuado alentecimento, freqüentes hesitações em iniciar os movimentos ou interrupções (3-6/ 5s) 4- executa a tarefa com muita dificuldade (0-2/ 5s)</p>	
<p>7-PRONAÇÃO E SUPINAÇÃO DAS MÃOS 0- normal 1- leve alentecimento ou movimentos irregulares 2- moderado alentecimento e movimentos irregulares 3- acentuado alentecimento e movimentos irregulares 4- não consegue executar a tarefa</p>	
<p>MSD MSE</p>	
	<p>8-LURIA 0- \geq 4/10 segundos, sem dica 1- $<$ 4/10 segundos, sem dica 2- \geq 4/10 segundos, com dica 3- $<$ 4/10 segundos, com dica 4- não consegue executar</p>
	<p>9-RIGIDEZ MSD MSE 0- ausente 1- leve ou presente apenas após ativação 2- leve a moderada 3- acentuada, consegue-se toda amplitude do movimento 4- grave, com limitação na amplitude completa do movimento</p>
	<p>10-BRADICINESIA CORPORAL 0- normal 1- leve lentidão (normal?) 2- leve lentidão, mas claramente anormal 3- moderada lentidão, alguma hesitação 4- acentuada lentidão, evidentes atrasos na iniciação</p>
	<p>11-DISTONIA TRONCO MSD MSE MID MIE 0- normal 1- leve/intermitente 2- leve/constante ou moderada/intermitente 3- moderada/comum 4- acentuada/prolongada</p>
	<p>12-CORÊIA FACE BOL TRONCO MSD MSE MID MIE 0- normal 1- leve/intermitente 2- leve/constante ou moderada/intermitente 3- moderada/comum 4- acentuada/prolongada</p>
	<p>13-MARCHA 0- marcha normal, base estreita 1- base alargada e/ou lenta 2- base alargada e anda com dificuldade 3- anda somente com auxílio 4- não consegue andar</p>
	<p>14-MARCHA PÉ-ANTE-PÉ 0- normal por 10 passos 1- 1 a 3 desvios da linha 2- $>$ 3 desvios 3- não consegue nem completar o percurso 4- não consegue nem iniciar</p>
	<p>15-ESTABILIDADE POSTURAL 0- normal 1- recupera-se espontaneamente 2- pode cair se não for aparado 3- tende a cair espontaneamente 4- não consegue ficar em pé</p>

<u>AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL</u>	
<u>GRAVIDADE (G):</u> 0= ausente 1= leve, questionável 2= leve 3= moderada 4= acentuada	<u>FREQUÊNCIA (F):</u> 0= nunca 1= raramente 2= às vezes 3= freqüentemente 4= quase sempre
→ <u>tristeza/humor</u> : Sente-se triste e angustiado? Acha que tem depressão? Chora freqüentemente e com facilidade? É no momento incapaz de se interessar/gostar de algo? Tem expressão e voz tristes.	
→ <u>baixa estima/culpa</u> : Tem sensação de culpa? Acha que é uma pessoa má ou que nada merece (sentimentos de autodepreciação)? Sente-se uma pessoa fracassada?	
→ <u>ansiedade</u> : É muito preocupado? Sempre pensa que o pior vai acontecer? Sente medo e tem muitos receios?	
→ <u>pensamentos suicidas</u> : Sente que não vale mais a pena viver? Pensa em se suicidar ou já teve esse pensamento? Chegou a se preparar para isso?	
→ <u>comportamento agressivo</u> : Tem um comportamento ameaçador, agressivo? Chega a ser violento e agredir fisicamente? Tem explosões verbais ameaçadoras? Fala de maneira exagerada, agressiva ou inconveniente?	
→ <u>comportamento irritadiço</u> : É impaciente e nervoso? É exigente e inflexível? É impulsivo e não colabora?	
→ <u>obsessões</u> : Idéias, pensamentos ou imagens recorrentes e persistentes, pensamentos fixos repetitivos de que algo terrível vai acontecer consigo ou com parentes; outros pensamentos repetitivos	
→ <u>compulsões</u> : Tem comportamentos repetitivos intencionais ("manias") excessivos ou ritualizados como: lavar as mãos, tomar banho, arrumar-se, escovar os dentes, verificar algo repetidamente, entrar/sair pela porta, sentar/levantar da cadeira, checar várias vezes, tocar, se "descontaminar", contar, guardar/colecionar coisas, cuidados com sujeira.	
→ <u>delírios</u> : Tem pensamentos irrealis, cultural e socialmente incompatíveis?	
→ <u>alucinações</u> : visuais, auditivas, tácteis, olfativas, gustativas?	
O examinador acredita que o paciente está confuso?	
O examinador acredita que o paciente está demenciado?	
O examinador acredita que o paciente está deprimido?	
O examinador acredita que o paciente necessita farmacoterapia para depressão?	

<u>AVALIAÇÃO FUNCIONAL</u>
<p>O paciente pode se engajar em um serviço remunerado na sua atividade profissional habitual?</p> <p>O paciente pode se engajar em qualquer tipo de serviço remunerado?</p> <p>O paciente pode se engajar em qualquer tipo de serviço não-remunerado ou voluntário?</p> <p>O paciente pode cuidar de seu movimento financeiro mensal sem ajuda?</p> <p>O paciente pode comprar mantimentos sem ajuda?</p> <p>O paciente pode lidar com troco no caso de uma compra?</p> <p>O paciente pode cuidar de crianças sem auxílio?</p> <p>O paciente pode dirigir um automóvel sozinho e com segurança?</p> <p>O paciente pode fazer seus serviços de casa sem ajuda?</p> <p>O paciente pode cuidar de suas roupas (lavar/secar/passar) sem ajuda?</p> <p>O paciente pode preparar suas refeições sem ajuda?</p> <p>O paciente pode usar o telefone sem ajuda?</p> <p>O paciente pode tomar suas medicações sem ajuda?</p> <p>O paciente pode se alimentar sozinho sem ajuda?</p> <p>O paciente pode se vestir sem ajuda?</p> <p>O paciente pode tomar banho sem ajuda?</p> <p>O paciente pode usar transporte público sem ajuda?</p> <p>O paciente pode ir sozinho a pé a lugares próximos de casa sem ajuda?</p> <p>O paciente anda sem cair?</p> <p>O paciente anda sem ajuda?</p> <p>O paciente se penteia sem ajuda?</p> <p>O paciente pode trocar de cadeira sem ajuda?</p> <p>O paciente pode deitar e levantar da cama sem ajuda?</p> <p>O paciente usa o banheiro sem ajuda?</p> <p>O paciente pode ser cuidado em casa?</p>

<u>CAPACIDADE FUNCIONAL</u>	<p>OCUPAÇÃO</p> <p>0 = incapaz</p> <p>1 = apenas serviços auxiliares</p> <p>2= capacidade reduzida no seu trabalho habitual</p> <p>3 = normal</p>
<p>ATIVIDADES DA VIDA DIÁRIA:</p> <p>0= ajuda total</p> <p>1= executa apenas atividades simples</p> <p>2= leve comprometimento</p> <p>3= normal</p>	<p>FINANÇAS:</p> <p>0= incapaz</p> <p>1= muita ajuda</p> <p>2= pouca ajuda</p> <p>3= normal</p>
<p>CUIDADOS EXIGIDOS</p> <p>0= necessita todo tempo de cuidados de enfermagem</p> <p>1= necessita de cuidados especializados</p> <p>2= em casa</p>	<p>TAREFAS DOMÉSTICAS:</p> <p>0= incapaz</p> <p>1=comprometido</p> <p>2= normal</p>

<u>ESCALA DE INDEPENDÊNCIA</u>
100% - Não precisa de cuidados especiais.
90% - Não precisa de auxílio se atividades físicas difíceis são evitadas.
80% - As condições de emprego anteriores à doença deterioraram ou parou de trabalhar; já não pode realizar as tarefas domésticas como antes; pode precisar ajuda com as finanças.
70% - Independente para o banho; as tarefas domésticas estão limitadas; não dirige mais; incapaz de lidar com as finanças.
60% - Necessita pequeno auxílio para vestir-se, higiene e banho. A comida precisa ser cortada para o paciente.
50% - Necessita de supervisão o dia todo; precisa de auxílio para o banho, higiene e alimentação.
40% - Necessita de cuidados especializados; alimentação limitada; dieta liquidificada.
30% - O paciente pouco colabora em se alimentar, no banho ou higiene.
20% - Não fala, precisa ser alimentado.
10% - Alimentado por sonda, acamado.

Índice de capacidade funcional total da UHDRS (Shoulson e Fahn, 1979)

	Comprometimento com o trabalho	Capacidade de lidar com finanças	Capacidade de administrar responsabilidades domésticas	Capacidade de realizar atividades de vida diária	O indivíduo pode ser cuidado em
Estágio 1	Usual	Total	Total	Total	Casa
Estágio 2	Levemente comprometido	Requer pequena assistência	Total	Total	Casa
Estágio 3	Moderadamente Comprometido	Requer grande assistência	Comprometida	Levemente comprometida	Casa
Estágio 4	Incapaz	Incapaz	Incapaz	Moderadamente Comprometida	Casa ou cuidados especializados
Estágio 5	Incapaz	Incapaz	Incapaz	Gravemente Comprometida	Apenas cuidados especializados