

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

LORRAINE POLTRONIERI PEREIRA

Estudo molecular da Doença de Huntington e correlações com  
as manifestações clínicas

VITÓRIA  
2015

LORRAINE POLTRONIERI PEREIRA

Estudo molecular da Doença de Huntington e correlações com  
as manifestações clínicas.

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

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Amorim

Melgaço Guimarães do Bem

Co-orientadora: Profa. Dra. Rita Gomes

Wanderley Pires

**VITÓRIA**

**2015**

## LORRAINE POLTRONIERI PEREIRA

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

### COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Amorim Melgaço Guimarães do Bem (Orientadora) – UFES

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rita Gomes Wanderley Pires (Co-orientadora) – UFES

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristina Martins e Silva – UFES

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia Imbroisi Valle Errera – EMESCAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

**Vitória, Agosto de 2015**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade  
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

Pereira, Lorraine Poltronieri, 1987-

P436e      Estudo molecular da doença de huntington e correlações  
com as manifestações clínicas/Lorraine Poltronieri Pereira– 2015.  
93f. : il.

Orientador: Daniela Amorim Melgaço Guimarães do Bem.

Coorientador: Rita Gomes Wanderley Pires.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da  
Saúde.

1. Doença de Huntington. 2. Diagnóstico clínico. 3. Expressão  
gênica. 4. Dineínas. I. Guimarães do Bem, Daniela Amorim  
Melgaço. II. Pires, Rita Gomes Wanderley. III. Universidade  
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV.  
Título.

CDU: 61

---

*Aos pacientes com a Doença de Huntington e familiares, por permitir a análise deste estudo.*

## AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais e meu irmão, pelo amor e apoio incondicional. São exemplos de coragem e determinação.

Às minhas orientadoras Dra. Daniela Amorim Melgaço Guimarães do Bem e Dra. Rita Gomes Wanderley Pires pela disponibilidade, compreensão e aprendizagem. 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.

À Dra. Maria do Carmo Souza Rodrigues, pela doçura, disponibilidade e por sempre acreditar neste trabalho.

À Dra. Vera Lucia Maia, Dr. Carlos Alberto Magirus Peixoto e Dr. Patrik Fontes, pela contribuição.

Aos estudantes de medicina, João Felipe Passoni Tonini e Luiz Henrique Libardi Silva, pela disponibilidade.

À todos do Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental, pelo convívio e por cederem espaço para as minhas práticas, em especial à Lorena (doutoranda) e Tamara (mestranda) por estarem sempre dispostas a ajudar e compartilhar seus conhecimentos.

Ao Laboratório Geneticenter Ltda, em especial à Layla Mosqueira, pelo apoio.

À todos os meus colegas de mestrado, pela convivência sempre divertida, em especial à minha companheira de laboratório, Nadmy, que foi muito importante nesta caminhada.

Às colegas do Laboratório de Bioquímica Clínica e Molecular, Lilian e Suellen, pela amizade e auxílio nas etapas iniciais do trabalho.

À oportunidade de reencontrar amigos da turma da faculdade nas disciplinas de mestrado, tão especiais pra mim: Alexandre, Flávia, Lívia e Aghiane.

À Prof. Dra. Cristina Martins e Silva, pela inspiração e pela boa vontade sempre.

Ao Prof. Marco Guimarães pelas críticas construtivas.

À Prof. Eliane e Daniele do Laboratório de Estatística da UFES pela correção estatística.

À Prof. Maria Aparecida Cicilini, pela contribuição e pelo diálogo.

À empresa em que tenho orgulho de fazer parte, Laboratório Tommasi, que sempre esteve ao lado da pesquisa científica e, não diferente, me ajudou a conciliar a fase acadêmica e profissional.

Aos meus colegas de trabalho, entre eles, Lenilson, pelas necessárias trocas de plantão.

Ao Dr. Jorge Terrão, assessor científico do Laboratório Tommasi, pela disponibilidade, apoio e amizade.

Ao Dr. Fabrício Antônio, coordenador da Biologia Molecular do Laboratório Tommasi, pela atenção e importante contribuição na fase de experimento.

À querida amiga e mestrandia Jaqueline, pela contribuição.

Aos meus amigos e familiares por compreender os momentos de ausência.

E por fim, agradeço àqueles que vivem o lado mais difícil da vida, os pacientes com a Doença de Huntington e familiares, aos quais dedico este estudo.

Muito obrigada!

“Quando abro a porta de uma nova descoberta, já encontro Deus lá dentro”

Albert Einstein

## RESUMO

A doença de Huntington (DH) é uma patologia neurodegenerativa progressiva, que conduz a um distúrbio motor, cognitivo e psiquiátrico. É causada pela expansão da repetição do trinucleotídeo CAG (citosina-adenina-guanina) no gene da huntingtina, resultando numa proteína mutante que provoca lesão cerebral. Estudo anterior do nosso grupo de pesquisa em modelo animal para DH observou alteração na expressão de genes relacionados à dineína e dinactina, responsáveis pelo tráfego celular e desenvolvimento neuronal. O objetivo deste estudo foi relacionar o diagnóstico molecular com as manifestações clínicas da DH e analisar a expressão dos genes dineína de cadeia pesada axonemal 6 (DNAH6), dineína de cadeia leve Tctex-tipo 1 (DYNLT1) e dinactina3 (DCTN3) nos pacientes. Os participantes do estudo foram classificados em grupo controle (n=12) e grupo com diagnóstico clínico de DH (n=25). O diagnóstico clínico foi realizado pela equipe médica do Ambulatório de Genética Clínica do Hospital Universitário Cassiano Antonio Moraes, UFES (HUCAM/UFES), por meio da Escala Unificada para avaliação da doença de Huntington (UHDRS). O diagnóstico molecular para DH foi confirmado em 68% dos pacientes selecionados. Neste estudo, foi observada correlação negativa entre a expansão CAG e a idade de início dos sintomas. A relação da gravidade da doença com a capacidade funcional total (TFC), assim como com o comprometimento motor foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). A expansão CAG e o comprometimento da função motora refletem-se negativamente na independência dos pacientes. Observou-se diminuição da expressão do gene DNAH6 nos pacientes com DH em relação ao grupo controle, que foi compatível com o observado na expressão deste gene no estriado de modelo animal com DH. Não houve alteração para os genes DYNLT1 e DCTN3. Com o estudo, considera-se importante avaliar a relação do diagnóstico molecular com o estudo clínico da escala UHDRS, fundamental para avaliar a taxa de progressão da DH nos pacientes. Sugere-se ainda que a avaliação da expressão do gene DNAH6, seja um possível marcador sanguíneo para as primeiras alterações celulares que antecedem as manifestações clínicas da DH.

Palavras-chave: Doença de Huntington, diagnóstico clínico, diagnóstico molecular, expressão gênica.

## ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is a progressive neurodegenerative disease that leads to motor, cognitive and mental impairment. It is caused by CAG (guanine-cytosine-adenine) trinucleotide repeat expansion in the huntingtin gene, resulting in a mutant form which causes brain damage. A previous study of our research group in an animal model for HD observed changes in gene expression related to dynein and dynactin responsible for cellular traffic and neuronal development. The aim of this study was to relate the molecular diagnosis with clinical manifestations of HD and analyze the expression of axonemal dynein heavy chain gene 6(DNAH6), dynein light chains Tctex-type 1 (DYNL1) and dynactin 3 (DCTN3) in patients. Participants of this study were divided into control group (n = 12) and group with clinical diagnosis of HD (n = 25). The clinical diagnosis was made by the medical team Clinical Genetics Clinic of the University Hospital Cassiano Antonio de Moraes, UFES (HUCAM / UFES) through the Unified scale for assessment of Huntington's disease (UHDRS). The molecular diagnosis of HD was confirmed in 68% of selected patients. In this study, we observed a negative correlation between the CAG expansion and the age of onset of symptoms. The relationship of disease severity with the overall functional capacity (TCF), as well as motor impairment was statistically significant ( $p < 0.05$ ). The CAG expansion and impairment of motor function are reflected negatively on the independence of patients. There was decreased expression of the gene DNAH6 in HD patients compared to the control group, which was consistent with that seen in the expression of this gene in the striatum of animal model with HD. There was no change to the DYNL1 and DCTN3 genes. In the study, we consider important the ratio of the molecular diagnosis with the clinical study of UHDRS scale essential to assess the rate of progression of the HD in patients. It also suggests that evaluating the expression of the gene DNAH6, is a possible blood marker for the early cellular changes that precede the clinical manifestations of HD.

keywords: Huntington's disease, clinical diagnostics, molecular diagnostics, gene expression.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACTB -  $\beta$ -actina

Ach – acetilcolina

CAG – Citosina-adenina-guanina

DH – Doença de Huntington

DNAH6 – Dineína de cadeia pesada axonemal 6

DYNLT1 - Dineína de cadeia leve Tctex-tipo 1

DCTN3 - Dinactina3

DEPC - água tratada com dietilpirocarboneto

GABA - ácido gama amino butírico

HAP1 – proteína associada a huntingtina

Htt – huntingtina

mGluR – receptor metabotrópico de glutamato

MTs - microtúbulos

MSNs - neurônios espinhosos médios

NMDAR - receptor ácido N-metil-D-aspártico

PCR- Reação em cadeia de polimerase

p150<sup>Glued</sup> - subunidade da dinactina

qPCR - PCR quantitativo em tempo real

UHDRS - Escala Unificada para avaliação da doença de Huntington

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Mecanismo de ação da htt nos neurônios.....28
- FIGURA 2 - Avaliação da expressão gênica de *DNAH6*, *DYNLT1* e *DCTN3* por qPCR no estriado de um modelo animal de DH .....31
- FIGURA 3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção da presença da htt mutante no gene *IT15* dos pacientes do grupo 2, através da técnica de PCR alelo específico.....51
- FIGURA 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção da presença da htt mutante no gene *IT15* dos pacientes do grupo 2, através da técnica de Nested PCR..... 51
- FIGURA 5 - Classificação dos alelos de acordo com o número de repetições de CAG nos pacientes com DH .....53
- FIGURA 6 – Gráfico de dispersão correspondente a correlação entre a idade do 1º sintoma e o número de repetições CAG no alelo expandido nos pacientes com DH.....55
- FIGURA 7 - Gráfico de dispersão correspondente a correlação entre a idade do 1º sintoma e o número de repetições CAG no alelo normal dos pacientes com DH.....56
- FIGURA 8 - Gráficos Box-plot correspondente ao número de repetições CAG do alelo expandido de acordo com a via de transmissão genética.....57
- FIGURA 9 – Gráfico Box-plot correspondente ao tempo de duração da doença e o estágio de gravidade no grupo de pacientes com DH .....58

FIGURA 10 – Gráfico Box-plot correspondente a avaliação funcional de acordo com o estágio de gravidade no grupo de pacientes com DH .....	59
FIGURA 11 – Gráfico Box-plot correspondente ao componente motor da escala UHDRS e o estágio de gravidade no grupo de pacientes com DH.....	59
FIGURA 12 – Gráfico de dispersão correspondente a correlação entre o componente motor da escala UHDRS e a independência dos pacientes com DH.....	61
FIGURA 13 - Gráfico de dispersão correspondente a correlação entre a repetição CAG do alelo expandido e a independência dos pacientes com DH.....	62
FIGURA 14 - Expressão relativa de mRNA do gene DNAH6, normalizada com o gene da $\beta$ -actina .....	63
FIGURA 15 - Expressão relativa de mRNA do gene DYNLT1, normalizada com o gene da $\beta$ -actina .....	63
FIGURA 16 - Expressão relativa de mRNA do gene DCTN3, normalizada com o gene da $\beta$ -actina .....	64
FIGURA 17 - Mecanismo de atuação da htt normal e mutante com o complexo dineína/dinactina no controle do transporte de vesículas de BDNF.....	74

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Condições de padronização da 1ª reação da PCR alelo específica.....	41
QUADRO 2 – Condições de padronização da 2ª reação da PCR alelo específica.....	42
QUADRO 3 – Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a 1ª e 2ª reação da PCR alelo específica .....	42
QUADRO 4 – Programa utilizado em termociclador para a 1ª e 2ª reação de PCR alelo específica .....	42
QUADRO 5 – Condições padronizadas para a 1ª e 2ª reação da Nested PCR.....	43
QUADRO 6 – Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na 1ª e 2ª reação de Nested PCR .....	43
QUADRO 7 – Programa utilizado em termociclador para a 1ª e 2ª reação da Nested PCR.....	44

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Seqüência dos iniciadores para avaliação da expressão gênica por qPCR .....	47
TABELA 2 - Características sociodemográficas dos participantes do estudo do grupo 2.....	49
TABELA 3 - Distribuição do resultado do seqüenciamento gênico do alelo normal e expandido nos pacientes do grupo 2.....	52
TABELA 4 - Distribuição do resultado do seqüenciamento gênico dos dois alelos nos participantes do grupo controle .....	52
TABELA 5 - Caracterização genética, étnica e clínica dos pacientes com DH.....	54
TABELA 6 - Análise descritiva da pontuação dos componentes da escala UHDRS nos pacientes com DH .....	58
TABELA 7 – Desempenho dos pacientes com DH em estágio moderado e grave na avaliação motora da UHDRS .....	60

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	18
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	19
2.1 Histórico .....	19
2.2 Epidemiologia .....	20
2.3 Aspectos Clínicos.....	22
2.4 Genética e Doença de Huntington .....	24
2.5 A Huntingtina e seu papel na DH .....	26
2.6 Fisiopatologia .....	28
2.7 Neurodegeneração e o transporte axonal.....	30
2.7.1 Dineína e Dinactina.....	30
2.8 Modelos experimentais para a DH .....	31
2.9 Alteração na expressão gênica do modelo <i>knock-in</i> para DH.....	32
2.10 Diagnóstico .....	34
2.11 Tratamento.....	35
3. OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivo geral.....	37
3.2 Objetivos específicos .....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	38
4.1 Casuística .....	38
4.2 Avaliação pela escala UHDRS.....	38
4.3 Amostra biológica.....	40
4.4 Avaliação Clínica .....	40
4.5 Diagnóstico molecular para DH.....	41
4.5.1 Extração de DNA nas amostras de sangue .....	41
4.5.2 Amplificação da expansão CAG pela técnica de PCR .....	42
4.5.2.1 PCR alelo específica .....	42
4.5.2.2 Nested PCR .....	44
4.5.3 Seqüenciamento genético .....	45
4.6 Avaliação da expressão gênica.....	46

4.6.1 Extração de RNA de amostras de sangue.....	46
4.6.2 Eletroforese em gel de agarose .....	47
4.6.3 Síntese de cDNA.....	47
4.6.4 Desenho dos iniciadores para qPCR.....	47
4.6.5 Reação de PCR em tempo real.....	48
4.7 Análise estatística .....	49
5. RESULTADOS.....	50
5.1 Caracterização dos pacientes .....	50
5.2 Diagnóstico molecular para DH .....	50
5.3 Avaliação genética e clínica dos pacientes do grupo DH .....	54
5.4 Avaliação da expressão gênica nos pacientes com DH .....	62
6. DISCUSSÃO .....	64
7. CONCLUSÃO .....	76
8. REFERÊNCIAS.....	78
APÊNDICE 1.....	87
APÊNDICE 2.....	88
ANEXO 1.....	90

## 1 INTRODUÇÃO

A doença de Huntington (DH), também conhecida como coréia de Huntington, foi descrita em abril de 1872 por George Huntington, autor da primeira publicação científica, a qual nomeou de coréia hereditária. O termo "coréia", derivado do grego, significa dança, e é uma designação muito apropriada para as alterações motoras presentes nesta síndrome, semelhantes a alguns passos de dança.

A doença é uma desordem neurológica degenerativa progressiva causada por uma expansão da repetição dos trinúcleotídeos CAG (citosina-adenina-guanina) presentes no gene IT15 no braço curto do cromossomo 4 (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). A trinca de trinucleotídeos CAG é responsável pela transcrição de um aminoácido chamado glutamina e a repetição sequencial de até trinta e cinco aminoácidos (poliglutamina) é característica da estrutura molecular normal da proteína Huntingtina (htt) (HERISHANU et al, 2008). Na DH, a expansão desta repetição gera a formação de uma proteína funcionalmente alterada que provoca a degeneração neuronal visto em várias regiões do sistema nervoso central, sendo mais evidente em neurônios do núcleo caudado e putâmen dos gânglios da base (MARTIN; GUSELLA, 1986).

A doença é herdada de forma autossômica dominante e leva a distúrbios do sono (ARNULF et al., 2008), disfunção motora, comprometimento cognitivo, distúrbios psiquiátricos (VONSATTEL e DIFIGLIA, 1998) e, finalmente, a morte prematura (DIFIGLIA et al., 1995). O início destes sintomas ocorre, geralmente, na quarta década de vida, no entanto pode variar de 4 a 80 anos de idade, o que vai depender de alguns fatores como, quantidade de repetições alteradas presentes no gene e sua herança genética materna ou paterna, visto que estes são determinantes para a manifestação clínica da doença (RAYMUND et al, 2011).

O diagnóstico da coréia de Huntington é realizado após a observação das manifestações clínicas típicas da síndrome, associada com uma história familiar positiva da doença. A confirmação do diagnóstico é feita utilizando a técnica de PCR, que permite a contagem do número de expansões CAG presentes no gene.

Estudos sobre a DH ainda são muito escassos na literatura, o que contribui para os poucos casos conhecidos em todo mundo. Dessa forma, esta pesquisa

pretende colaborar com avanços no conhecimento desta doença, na prevalência no estado do Espírito Santo, sua origem, bem como em novos tratamentos que melhorem a qualidade de vida dos pacientes e de seus familiares.

A participação nesta pesquisa possibilitará o diagnóstico aos participantes sintomáticos. Mesmo que o tratamento não sofra modificações, a realização dos exames num portador sintomático de DH permite a identificação da patogênese da doença e poderá contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos.

Em estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa (RIBEIRO; PIRES et al., 2013) foi observada alteração na expressão de genes relacionados a várias proteínas importantes para o desenvolvimento neuronal da região dos gânglios da base, assim como para proteínas relacionadas à sinalização intracelular. Sendo assim, amostras obtidas dos pacientes com DH, bem como de indivíduos que não apresentam mutação da *htt* (grupo controle), foram coletadas para realização da PCR em tempo real para confirmarmos se as alterações na expressão gênica observada em camundongos modelos da DH também são observadas em pacientes. Esses dados são essenciais para determinarmos se os resultados obtidos em modelos animais apresentam relevância clínica. Isto nos dará suporte para um melhor entendimento dos mecanismos que levam aos sintomas clínicos da DH, os quais irão contribuir para o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas que possam efetivamente tratar a doença de forma mais específica e sem efeitos colaterais, proporcionando uma melhora na qualidade de vida.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Histórico**

A Doença de Huntington é reconhecida como doença desde a Idade Média, no entanto, a sua causa permaneceu incerta até recentemente (HUNTINGTON, 2003). Os relatos prévios não tiveram grande divulgação. A primeira referência a DH foi numa carta de Charles Oscar Waters, publicada na primeira edição da “Practice of Medicine” em 1842. Diz Waters que os pacientes sofriam alterações variáveis da atividade muscular, com gravidade desigual, mas acabando todos por desenvolver gradualmente e de forma uniforme uma situação de demência. Em 1846, Charles

Gorman observou a elevada prevalência da doença em determinadas regiões. Independentemente de Waters e Gorman, Lund também fez uma descrição da doença em 1860. Lund verificou que em um vale isolado na Noruega, existia uma alta prevalência de demência associada a um padrão de movimentos involuntários arrítmicos, que parecia estar restrito a determinadas famílias (LANSKA, 2000).

No entanto, a primeira descrição mais aprofundada, foi feita por George Huntington em 1872. George Huntington notou as três características determinantes da doença: o seu caráter familiar, a tendência progressiva e inexorável para a insanidade e suicídio e o fato de se manifestar na idade adulta (OSLER, 1908). Dessa investigação, resultou a primeira publicação de Huntington, na qual apresentou uma definição precisa e detalhada da doença, juntamente com a descrição exata do padrão de herança autossômica dominante. O trabalho de Huntington despertou o interesse de vários cientistas da época, principalmente na Europa. No final do século XIX, a doença foi reconhecida como uma doença global (LANSKA, 2000).

## **2.2 Epidemiologia**

A prevalência global da doença varia muito, tanto geograficamente, como em função da etnia e dos padrões de migração local e entre regiões. A DH foi descrita em diversos países e afeta todas as raças, embora ocorra maior frequência do gene em pessoas de origem caucasiana (WEXLER et al., 1985)

Pringsheim e outros (2012) estimaram uma prevalência da DH de 5,70/100.000 nas populações da Europa, América do Norte e Austrália e revelou uma prevalência significativamente menor de HD na Ásia com 0,40 por 100 mil. A DH também pode ser frequente na Índia e em partes da Ásia central, mas é especialmente rara na Finlândia e no Japão. No entanto, os dados para a Ásia Oriental e África são inadequadas e o transtorno pode ter sido subestimado na população negra americana. De acordo com estudos de Morrison e cols (2012), no Reino Unido, a prevalência da doença na Irlanda do Norte aumenta progressivamente, bem como

em partes da República da Irlanda que em 1991 foi de 6,4 em 100 mil habitantes e em 2001 foi de 10,6/100 mil.

Em algumas áreas, tais como certas regiões da Tasmânia e as margens do lago Maracaibo na Venezuela, a prevalência é particularmente maior que em outras regiões, sugerindo a influencia do efeito do fundador. (PARADISI et al., 2012). Em 1955, um médico venezuelano, Américo Negrette, clínico rural, numa comunidade particularmente pobre nas margens do Lago Maracaibo na província de Zulia, observou um vasto número de doentes que caminhavam de forma trôpega e desequilibrada. Da observação de muitas famílias concluiu tratar-se da DH, e que esta afetava várias pessoas com interligações entre si, descendentes de um antepassado comum. Sua descoberta foi apresentada ao “6º Congresso de Ciências Médicas da Venezuela” e, a partir daí, o interesse pelo Lago Maracaibo foi imediato. Esta população passou a ser alvo de especializada investigação, o que conduziria à identificação da mutação genética responsável pela doença (OKUN; THOMMI, 2004).

No Brasil, os poucos estudos epidemiológicos da doença, dificultam a obtenção de dados sobre a real prevalência ou incidência da DH. Entre eles, o estudo de Lima e Silva e cols (2000), identificou 30 indivíduos com a doença em 34 famílias distintas distribuídos nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná.

Trabalhos de Warby e cols em 2009, propuseram uma explicação para a variabilidade de prevalência de DH: foi identificado, em populações da Europa Ocidental, dois grupos de polimorfismos de nucleotídeo único localizados no gene da DH que são herdados juntamente com as longas repetições de CAG. Estes dois grupos de polimorfismos de nucleotídeo único constituem dois haplótipos que são altamente predispostos à instabilidade CAG. Em outras regiões, como China e Japão, estes haplótipos não são abundantes na população e, desta forma, as taxas de mutação de expansão CAG são baixas (WARBY et al., 2011).

A falta de estudos recentes de diagnóstico molecular para confirmação de DH ainda é um problema para o estudo epidemiológico da doença. O desconhecimento sobre a doença, o fato de que, até há muito pouco tempo, o diagnóstico era exclusivamente clínico e, lamentavelmente, o preconceito que leva as famílias a esconderem a sua situação da sociedade (WEXLER, 2010). Portanto, as atuais estimativas de prevalência, devem ser consideradas como mínimas e precisam ser repetidas ou utilizadas múltiplas fontes de apuração para melhorar a precisão.

## 2.3 Aspectos Clínicos

A DH é um distúrbio degenerativo progressivo que causa alterações no controle motor e emocional, prejuízo da habilidade cognitiva e o aparecimento de movimentos involuntários, classicamente a coréia (LI; LI, 2004).

A coréia é o movimento involuntário mais comum em pacientes com DH. Inicialmente, os movimentos ocorrem freqüentemente nas extremidades distais, tais como os dedos das mãos e pés, mas também em pequenos músculos faciais. Aos poucos, os movimentos indesejados se espalham para outros músculos. Movimentos diários como falar e engolir tornam-se gradualmente mais problemático podendo a qualquer momento levar à asfixia (RAYMUND et al, 2011).

No artigo original em 1872, George Huntington descreveu uma série de alterações, caracterizando o quadro sindrômico em que o sinal mais marcante e típico é um espasmo afetando os músculos voluntários sem ocorrer perda da consciência.

*“A doença comumente se inicia por leves abalos dos músculos da face, que aumentam gradativamente em violência e variedade. As pálpebras são mantidas piscando, a testa franzida depois elevada, o nariz torcido para um lado e depois para o outro e a boca se volta em direções variadas, dando ao paciente a aparência mais ridícula que se possa imaginar. Parece haver alguma força oculta, algo que está de certa forma brincando com a vontade e de algum modo dificultando e pervertendo seus desígnios; e depois que a vontade pára de exercer sua força numa direção qualquer, assume o controle e mantém a pobre vítima numa agitação continua enquanto ela permanece acordada”.*

Todos os pacientes desenvolvem bradicinesia, acinesia, rigidez, levando a dificuldade de se iniciar movimentos e apresentarem um ritmo mais lento para realizar suas atividades. A distonia também presente, é caracterizada por movimentos lentos, com um aumento do tônus muscular levando a postura anormal (RAYMUND et al, 2011). Além das alterações motoras que estão presentes em 60% dos novos casos, existem importantes problemas comportamentais frequentes em

15% dos pacientes e uma combinação desses sintomas em 25% dos casos (DI MAIO et al., 1993). Sintomas psiquiátricos como irritabilidade e comportamento agressivo estão presentes durante muitos anos antes do aparecimento dos sintomas motores. Outros problemas logo aparecem como; mudanças de personalidade, impulsividade, ansiedade, depressão, mania, apatia, isolamento social e distúrbios sexuais (HO AK; SAHAKIAN et al., 2003). É marcante a tendência à insanidade, logo os distúrbios psiquiátricos podem levar os pacientes ao suicídio (HUNTINGTON, 2003). Esta é uma consequência da degeneração gradual e contínua de neurônios no núcleo caudado e putâmen (MINK, 1996).

Os sintomas de disfunção executiva são os primeiros sinais de declínio cognitivo em DH. Neste estágio, ocorre um prejuízo na memória, na capacidade de planejamento, na organização e concentração (WALKER, 2007). A mortalidade geralmente surge a partir de complicações, como pneumonia - decorrente da disfagia - e doenças cardiorespiratórias (ZUCCATO; CATTANEO, 2009).

Com relação à idade de início da doença, esta ocorre geralmente entre 30 e 50 anos, embora já tenha sido observado aos 2 e aos 80 anos de idade. A gravidade correlaciona-se com o número de repetições CAG codificados em htt mutante. Os indivíduos com maior expansão de glutaminas apresentam um início mais precoce da doença e, conseqüentemente, uma expressão mais grave nas gerações seguintes, isso caracteriza a antecipação genética na DH (SNELL et al., 1993).

A idade atrasada da manifestação também é uma característica presente na DH, em que a seleção natural contra o gene é reduzida, visto que as pessoas que desenvolvem a doença, em geral, já tiveram filhos antes de estarem cientes sobre a presença da mutação no gene (JORDE, 2000). Se as primeiras manifestações clínicas começam antes da idade de 20 anos (10% dos pacientes), a doença é chamada de Doença de Huntington Juvenil (DHJ). A frequência de DHJ abaixo dos 10 anos de idade foi estimada em cerca de 3-10% dos casos (HAYDEN, 1981) e está relacionada com expansão maior que 60 trincas de CAG. (TELENIUS et al., 1993). Em decorrência disso, a DHJ apresenta um fenótipo atípico, com problemas de aprendizagem, rigidez, distonia, parkinsonismo progressivo, convulsões, demência, (CANNELLA et al., 2004), sendo esta manifestação precoce associada a transmissão de origem paterna (HAYDEN, 1981; HARPER, 1991).

Estudo de Myers e cols (1988) demonstrou, por meio de critérios clínicos e patológicos, que a DHJ, em geral, apresenta progressão acelerada, ao passo que, os pacientes tardiamente acometidos normalmente apresentam uma evolução mais branda. A análise do tecido cerebral desses pacientes revelou que o grau de envolvimento neuronal do corpo estriado é inversamente proporcional à idade do início dos sintomas.

Um sinal precoce da doença é a incapacidade de realizar, corretamente, movimentos seqüenciais de maneira rápida e harmônica. Alterações sutis na marcha podem ser observadas no começo da doença e, com a sua progressão, as dificuldades tornam-se maiores (WILLINGHAM; KOROSHETZ, 1993).

Esta característica precoce foi analisada em dois estudos que compararam portadores assintomáticos do gene da DH com pessoas não portadoras desse gene, e revelou alterações discretas na função motora e no tempo de reação à estímulos auditivos e visuais entre os indivíduos portadores do gene que não exibiam, até o momento, movimentos coréicos definidos e não possuíam sinais suficientes para que o diagnóstico clínico da DH fosse realizado (KIRKWOOD et al., 2000).

Reflexos hiperativos ocorrem precocemente em até 90% dos pacientes, enquanto clônus e resposta plantar em extensão (sinal de Babinski) manifestam-se tardiamente e são menos freqüentes. A resposta plantar em extensão é predominante nos casos juvenis ou em adultos no estágio avançado da doença. É visto, portanto, que existe uma variabilidade importante de sintomas entre as fases precoces e tardias da doença, que está relacionada com a sua gravidade e duração. Quando a DH se manifesta no adulto, a doença persiste por 15 a 20 anos até a morte, e quando se apresenta como variante juvenil, persiste por 8 a 10 anos (JORDE, 2000).

## **2.4 Genética e Doença de Huntington**

A DH é uma doença monogênica e o seu gene mutante foi mapeado próximo a extremidade telomérica do braço curto do cromossoma 4 (região 4p16.3), por James Gusella e colaboradores no ano de 1983. Depois de uma década de pesquisa do gene que causa a doença, o *IT15* gene foi identificado em 1993 por técnicas de clonagem. A análise da seqüência de DNA mostrou uma repetição

expandida do trinucleotídeo CAG na extremidade distal do gene (HUNTINGTON DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP, 1993). A trinca de CAG é responsável pela transcrição de um aminoácido chamado glutamina e a repetição sequencial de até trinta e cinco aminoácidos (poliglutamina) é característica da estrutura molecular normal da proteína htt (WARBY et al., 2011).

A DH é transmitida hereditariamente como uma doença autossômica dominante e todos os indivíduos que possuem o genótipo para doença irão apresentar sinais e sintomas em algum momento da sua vida (SEMAKA et al., 2006).

Este tipo de herança apresenta algumas peculiaridades. Primeira, os dois sexos exibem a característica em proporções aproximadamente iguais e os homens e mulheres têm a mesma probabilidade de transmitir a característica para seus descendentes. Segunda, o padrão de transmissão é vertical, o fenótipo da doença é visto em gerações seguidas, assim, se o filho for afetado pela doença é porque um dos seus genitores é afetado ou se nenhum dos genitores tiver a característica, os filhos também não terão. Terceira, é observado a transmissão do gene da doença diretamente de pai para filho, o que exclui a herança ligada ao cromossomo X. Finalmente, nesta doença, um heterozigoto afetado transmite a característica para metade da sua prole, embora seja possível que todos ou nenhum dos filhos de um genitor seja afetado (JORDE, 2000).

São raros os casos em que ambos os progenitores têm um gene *IT15* expandido, e nessa situação, sobe para 75% o risco para a descendência, e se qualquer um dos progenitores apresentarem duas cópias expandidas, todos os descendentes serão afetados. Até pouco tempo, a DH era conhecida como a única doença na qual a homozigose não influenciava os sintomas ou a progressão da doença, porém, verificou-se que tanto o fenótipo como a taxa de progressão da doença são influenciados negativamente pela existência do segundo gene afetado pela mutação (SQUITIERI et al., 2003).

A anormalidade no gene foi identificada como repetições expandidas instáveis do trinucleotídeo CAG (HERISHANU et al., 2009). Portanto, nos cromossomos normais há entre 5 e 35 repetições, no entanto, pessoas com seqüências de CAG entre 27 e 35 apresentam o alelo normal mutável, o que representa uma faixa de classificação intermediária com potencial expansão nas próximas gerações. Já nos pacientes com DH, as repetições são na ordem de 36 a 100 CAG (KREMER et al.,

1995). Indivíduos assintomáticos com 36 a 39 repetições apresentam uma forma de penetrância incompleta, com início de sintomas mais tardios e progressão mais lenta. Os indivíduos com repetições CAG maiores ou igual a 40, apresentam penetrância completa, com sintomas clássicos (QUARRELL et al., 2007).

Vale ressaltar que o número de repetições de trinucleotídeos é instável de uma geração para outra, decorrente de uma falha no processo meiótico e mitótico da gametogênese. A herança materna pode ocasionar um aumento ou uma diminuição da ordem de 3-4 repetições. Por outro lado, a herança paterna ocasiona, mais comumente, um aumento das repetições, chegando mesmo a dobrar o seu número. Isto ocorre devido a maior instabilidade das repetições durante a espermatogênese, visto que, por razões ainda não compreendidas, a instabilidade meiótica é maior no homem do que na mulher (GOLDBERG et al, 1993). A partir disto, uma significativa correlação entre o número de repetições dos trinucleotídeos CAG e idade de início da DH foi demonstrada por diversos autores. Foi verificado que, quando o gene herdado vinha do pai, os sinais e sintomas da DH surgiam mais cedo (DHJ) devido à maior expansão (CAG)<sub>n</sub>. Já quando a herança é materna, os sinais e sintomas da DH aparecem mais tardiamente por volta da quarta ou quinta década, correlacionado com um menor número de expansões CAG (KREMER et al., 1995).

A expansão anormal da trinca de CAG está presente e é reconhecida como causa de várias outras doenças degenerativas do sistema nervoso, entre elas: Atrofia espinocerebelar-1, Atrofia denteadorrubra-palidolusiana, doença de Machado-Joseph e Atrofia muscular espinhal e bulbar (ZOGHBI, 1996). Devido a esta variedade de doenças com genética e sintomas similares a DH, é importante um diagnóstico genético de diferenciação para correto tratamento.

## **2.5 A Huntingtina e seu papel na DH**

A htt é uma proteína que contém 3.144 aminoácidos e um peso molecular de aproximadamente 350kDa. Localiza-se normalmente no citoplasma de células somáticas e no núcleo e citoplasma dos neurônios (SHARP et al., 1995). Está expressa em todas as células humanas, embora com maior concentração no tecido cerebral e concentrações inferiores no fígado, coração e pulmões (LI;LI, 2004). Sua

função ainda não é bem esclarecida, embora se saiba que desempenha um papel importante no desenvolvimento embrionário, já que a sua ausência está relacionada com morte embrionária (CATTANEO et al., 2005).

As alterações cerebrais que envolvem a htt na sua forma mutante são bastante complexas e variadas, sendo, portanto, motivo de atuais investigações sobre seu mecanismo. Estudos relevantes como de Gervais e colaboradores (2002), mostram a interação da htt com algumas proteínas importantes para endocitose e secreção de neurotransmissores. Em células nervosas, a htt, normalmente, forma um complexo com as proteínas Hip1, clatrina e AP2, que estão envolvidos na endocitose. Portanto, a htt parece participar do processo de transcrição, sinalização celular e transporte intracelular (CATTANEO et al., 2005).

Em uma das hipóteses investigadas, quando ocorre a alteração conformacional da proteína htt como acontece na DH – com adição de glutaminas – esta tem sua função modificada, por enfraquecimento da ligação com Hip1. Em seguida, esta proteína interage com outra proteína identificada como Hipp1, que parece ativar a caspase-8 e conseqüentemente a cascata apoptótica. Nesta cascata, a ativação de caspase-8 pode desencadear alteração na mitocôndria que, em seguida, libera o citocromo c e ativa a caspase-3, que por sua vez, cliva a htt mutante gerando fragmentos que podem formar agregados no núcleo das células - figura 2 (GERVAIS., et al, 2002).

É visto também que, devido a sua natureza polar, as cadeias de htt mutante formam ligações de hidrogênio entre si e com outras proteínas, favorecendo a formação de agregados protéicos, em vez de se dobrarem em proteínas funcionais. Estes agregados acumulam-se e podem interromper a ação dos neurotransmissores, por impedir o movimento das vesículas no citoesqueleto. É essencial observar, que esta alteração na comunicação celular, implica negativamente na função mitocondrial, que é essencial para fornecimento de energia celular e regulação homeostática, à medida que altera o tráfego axonal retrógrado, gerando estresse oxidativo e contribuindo para citotoxicidade e neurodegeneração (ORR, 2008).

Dessa forma, um conjunto de fatores como a ativação de caspases e apoptose, a excitotoxicidade gerada pelos agregados da htt, os danos por radicais livres, as alterações na endocitose, no transporte vesicular, na transmissão sináptica e

inibição de transcrição, contribuem para a morte celular e modificação dos circuitos neuronais, que é característico das doenças degenerativas. (LIM et al, 2008).

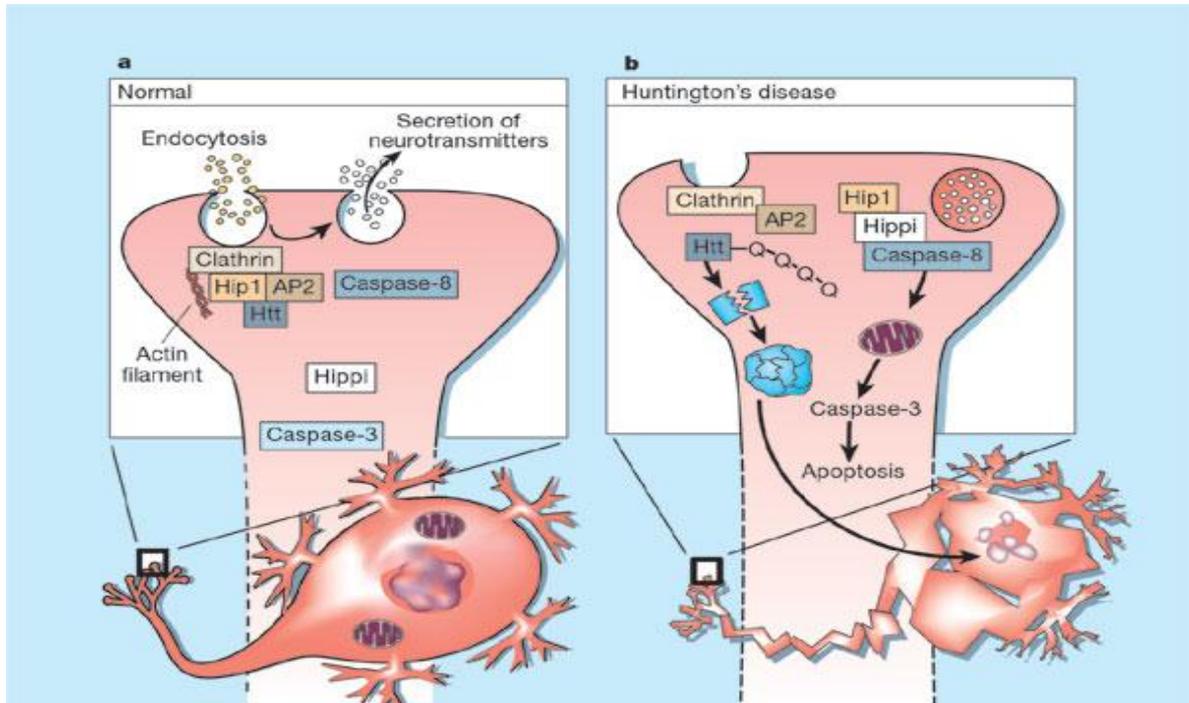


Figura 1 – Mecanismo de ação da htt nos neurônios: a) atividade normal da htt. b) atividade da htt mutante

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

## 2.6 Fisiopatologia

A DH afeta todo cérebro, mas a região mais vulnerável e onde ocorrem os efeitos mais evidentes, são nos núcleos da base - em particular o estriado, que é composto pelo núcleo caudado e putâmen. Os neurônios espinhosos médios (MSNs) compreendem 80% das células do corpo estriado, são gabaérgicos e se projetam do estriado para o globo pálido e para a porção reticular da substância negra. As inclusões de htt encontradas nos neurônios dos núcleos da base apresentam potencial capacidade em depletar substâncias próprias dos neurônios como GABA (ácido gama amino butírico), encefalinas, substância P, dentre outras. Acredita-se que os movimentos anormais da DH sejam causados pela perda da maioria dos corpos celulares dos neurônios secretores de GABA no núcleo caudado e no putâmen e dos neurônios secretores de acetilcolina (Ach) em muitas partes do cérebro (COLINS,1997). As terminações axonais dos neurônios gabaérgicos

normalmente causam inibição do globo pálido e da substância negra. A perda da inibição parece permitir descargas espontâneas de atividade do globo pálido e da substância negra que provocam os movimentos de distorção. O sintoma clínico de demência, provavelmente não resulta da perda dos neurônios GABA, mas sim, de neurônios secretores de Ach, provavelmente localizados nas áreas do córtex cerebral (VONSATTEL, et al., 1985).

Desta forma, 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 córtex, e que a liberação maciça de glutamato pelos terminais cortico-estriatais pode ser responsável pelo aumento da excitotoxicidade no estriado e conseqüente degenerescência deste (JANUÁRIO, 2011).

Embora a presença de htt mutante seja prejudicial a muitos subtipos neuronais, os MSNs do estriado são os primeiros neurônios afetados pela doença (ZUCCATO; CATTANEO, 2009). Esta observação tem sido atribuída a vários fatores, entre eles, a excitotoxicidade seletiva nesta área, que pode ser devido aos altos níveis de receptores de glutamato, principalmente os N-metil-ionotrópicos D -receptores do ácido aspártico (NMDAR), que são hiperestimulados, o que conduz ao excesso de influxo de cálcio e, eventualmente, resulta na ativação da morte das células (RIBEIRO et al., 2011)

O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante no sistema nervoso central e está associado com a plasticidade sináptica e aprendizagem. Este se liga e ativa o NMDAR, o que, normalmente, é uma interação transitória. No entanto, um excesso de glutamato extracelular pode levar à estimulação contínua de NMDAR e morte neuronal (RAYMOND et al., 2011). Receptores metabotrópicos de mGluR do Grupo I também têm sido implicados na morte das células neuronais, no entanto, existem relatos contraditórios em relação ao papel de mGluR. Estudos defendem que a htt mutante altera a sinalização do mGluR, uma vez que ativa vias de proteção neuronal na fase inicial assintomática da doença, mas na fase tardia essa proteção é perdida, gerando morte neuronal e desenvolvimento de sintomas (RIBEIRO et al., 2011). Assim, a sinalização do glutamato via ambos os receptores, ionotrópico e metabotrópico, estão relacionados com a função da htt mutante na DH.

## **2.7 Neurodegeneração e o transporte axonal**

A relação entre o tráfego intracelular e o acúmulo de agregados protéicos, levando à progressão da morte neuronal, ainda não está bem estabelecida nos trabalhos que tratam do mecanismo de neurodegeneração.

Os agregados protéicos em excesso, acumulam-se nos axônios e dendritos dos neurônios, e podem interromper a ação dos neurotransmissores, por impedir o movimento das vesículas no citoesqueleto. Isso implica em diminuição da liberação de neurotransmissores e no aumento de inclusões celulares (ARRASATE; FINKBEINER, 2012). Estes podem ser encontrados em todo o sistema nervoso central e estão envolvidos com a neurodegeneração relacionada ao envelhecimento e às doenças neurodegenerativas como o mal de Alzheimer, a doença de Parkinson, a Doença de Huntington, dentre outras. Há evidências de que alterações do tráfego intracelular antecedem a formação desses agregados protéicos, 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) .

O transporte axonal é responsável por movimentos bidirecionais de um grande número de componentes celulares, como mitocôndrias, endossomos, e precursores de vesículas sinápticas (SVs). Muitos processos biológicos são facilitados por estas organelas, incluindo sobrevivência neuronal, desenvolvimento, aprendizado e memória (BORGONOVO et al., 2006).

### **2.7.1 Dineína e Dinactina**

Nas células eucarióticas existem redes de proteínas que formam o citoesqueleto, do qual compreendem três classes distintas de filamentos: os microfilamentos de actina, os microtúbulos (MTs) e os filamentos intermediários. O citoesqueleto fornece rigidez e força para manter a forma da célula e permitir o movimento de organelas e vesículas durante o processo de tráfego intracelular (HORGAN; MCCAFFREY, 2011).

Existem duas superfamílias de proteínas motoras que se movem sobre os MTs: A superfamília das quinesinas (KIFs) que participam do transporte anterógrado e a superfamília das dineínas (DYNs), que se movem da porção distal (dos terminais

axonais ou dendríticos) em direção ao corpo celular, participando do transporte retrógrado (VALLEE et al., 2004).

A proteína motora dineína, também conhecida como dineína cerebral ou dineína citoplasmática, foi descoberta em 1987 (LYE et al., 1987). Ela é composta por duas cadeias pesadas, três cadeias intermediárias, e quatro cadeias leves (PASCHAL et al., 1987).

A dinactina se associa diretamente com a dineína e os componentes das vesículas e organelas, controlando o transporte retrógrado (KWINTER et al., 2009). As dineínas interagem com uma variedade de proteínas que não pertencem ao complexo estrutural, mas que são cruciais para suas funções celulares. Além do transporte retrógrado, destaca-se o papel das dineínas na depuração de agregados protéicos, importante em doenças neurodegenerativas (KARDON; VALE, 2009).

Normalmente, sabe-se que a dineína e dinactina interagem com a htt, através da ligação da p150<sup>Glued</sup> (subunidade da dinactina) com a HAP1 (proteína associada a htt), formando um complexo htt / HAP1 / p150, o que favorece o transporte vesicular em direção ao centro da célula. No entanto, a htt mutante perturba a integridade deste complexo, alterando o transporte axonal e contribuindo para a morte neuronal (CAVISTON et al., 2007).

## 2.8 Modelos experimentais para a DH

Desde a identificação da mutação na doença de Huntington em 1993 (HUNTINGTON DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP, 1993), muitos estudos propõem esclarecer os mecanismos patológicos da htt mutante por meio de modelos animais que são capazes de reproduzir o fenótipo característico da doença, através do cruzamento das linhagens para DH. Estes modelos são ferramentas valiosas para dissecar os mecanismos comportamentais e moleculares da DH, bem como para a avaliação de potenciais abordagens terapêuticas.

Três tipos de modelos de ratos têm sido desenvolvidos para estudo da DH: modelos knockout, transgênico, e knock-in (WHEELER, et al., 2000).

As linhagens de camundongos transgênicos são obtidas através da inserção do gene codificante para a proteína Htt humana inteira (BACHD e YAC128) ou apenas

a sua região amino-terminal (R6/2). As linhagens *knock-in* (*Hdh*<sup>Q111/Q111</sup>), são camundongos com uma expansão de 111 glutaminas na região amino-terminal. Estes últimos foram desenvolvidos através da substituição do primeiro exon do gene *htt* murino pelo primeiro exon do gene *htt* humano e oferecem o mecanismo patogênico mais próximo da condição humana (MENALLED et al., 2005).

## 2.9 Alteração na expressão gênica do modelo *knock-in* para DH

Numerosos estudos, tanto em pacientes com DH quanto em modelos de ratos, demonstraram que a *htt* mutante pode alterar a função neuronal e a sinalização celular, interrompendo as vias de transcrição e alterando perfis de expressão gênica do estriado. Neste sentido, um estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa em modelo animal para DH (RIBEIRO et al, 2013), demonstrou uma alteração na expressão gênica em camundongos modificados para DH, estes resultados conduziram a investigação da expressão gênica em humanos com a DH.

No estudo de Ribeiro e cols (2013) foi utilizado o modelo animal *knock-in* (*Hdh*<sup>Q111/Q111</sup>), com a expansão de 111 glutaminas na região amino-terminal, e o modelo *knockout* para o mGluR5 (*mGluR5*<sup>-/-</sup>) a fim de investigar o papel do mGluR5 nas alterações motoras observadas em um modelo animal para DH, já que nos camundongos a *htt* mutante conduz a dessensibilização dos receptores mGluR5, resultando em menor formação de IP3 e aumento da liberação de Ca<sup>2+</sup> dos estoques intracelulares no estriado (ANBORGH, et al., 2005). Portanto, os resultados deste trabalho demonstraram que o modelo da linhagem (*Hdh*<sup>Q111/Q111</sup>/*mGluR5*<sup>-/-</sup>), apresentou redução de inclusões nucleares no estriado, bem como redução da atividade locomotora quando comparado com seus respectivos controles, (*Hdh*<sup>Q111/Q111</sup>/*mGluR5*<sup>+/+</sup>) e (*Hdh*<sup>Q20/Q20</sup>/*mGluR5*<sup>-/-</sup>).

Estes resultados não eram esperados, visto que o bloqueio do receptor, normalmente, causaria o aumento da locomoção. Assim, a adaptação do receptor frente à *htt* mutante na modulação de aspectos funcionais da doença sugeriu a investigação da expressão gênica em modelo de camundongos com DH nocautes para o receptor mGluR5, a fim de entender esta resposta compensatória.

Sendo assim, o estudo de Ribeiro e cols (2013), mostrou que existe alteração na expressão de vários genes no estriado de modelo de camundongos com DH,

principalmente com relação aos genes que codificam as proteínas dineína e dinactina, relacionados ao transporte axonal e associados aos processos de morte celular, sendo eles: Dineína de cadeia pesada axonemal 6 (DNAH6), Dineína de cadeia leve Tctex-tipo 1 (DYNLT1) e Dinactina3 (DCTN3). Portanto, a reação de PCR quantitativa confirmou maior expressão (*upregulated*) dos genes DNAH6 e DYNLT1, bem como menor expressão (*downregulated*) do gene DCTN3 no estriado destes animais quando comparados as linhagens ( $Hdh^{Q111/Q111}/mGluR5^{-/-}$ ) e ( $Hdh^{Q20/Q20}/mGluR5^{-/-}$ ) - Figura 2.

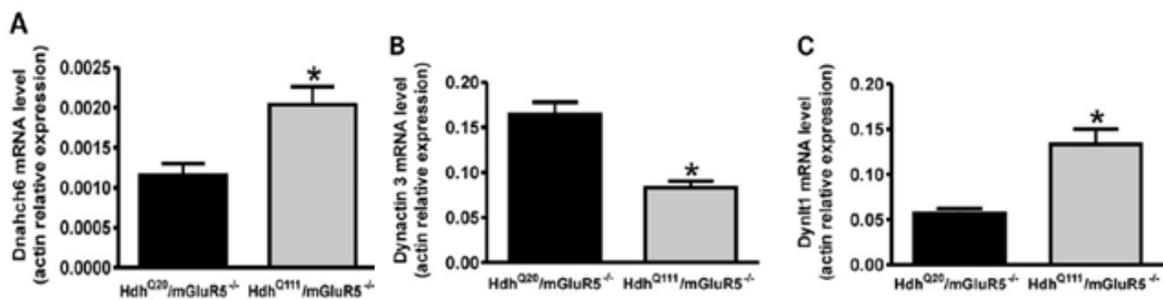


Figura 2 - Avaliação da expressão gênica de *DNAH6*, *DYNLT1* e *DCTN3* por qPCR das linhagens ( $Hdh^{Q111/Q111}/mGluR5^{-/-}$ ) x ( $Hdh^{Q20/Q20}/mGluR5^{-/-}$ ): upregulated dos genes DNAH6 e DYNLT1 e downregulated do gene DCTN3.

Fonte extraída de (RIBEIRO et al, 2013).

## 2.10 Diagnóstico

O diagnóstico da DH envolve vários critérios clínicos, como a constatação dos sinais e sintomas característicos da doença, a história familiar positiva e o teste genético molecular realizado pela técnica de PCR. O método de neuroimagem como a ressonância magnética nuclear é usado para identificar as regiões alteradas dos núcleos caudados e putamên, responsáveis pelos sintomas clínicos.

Para avaliação clínica dos sinais e sintomas da DH é utilizada a Escala Unificada para avaliação da doença de Huntington (UHDRS), desenvolvida em 1996 por uma organização internacional de Grupo de estudos da DH. Este é um instrumento para estudo clínico, estandardizado, validado, cobrindo vários componentes da doença por meio de testes e questionários que permitem a classificação abrangente da gravidade da doença.

A escala UHDRS avalia a gravidade do comprometimento motor, comportamental, funcional e cognitivo que são projetados para avaliar o auto-cuidado dos pacientes, assim como suas necessidades sociais e financeiras (KLEMPÍR et al.,2006).

O diagnóstico molecular é utilizado atualmente para confirmar se um paciente com a suspeita clínica, realmente apresenta a DH. Como existem variedades do número de repetições de trincas de CAG em cada paciente, é importante especificar a quantidade de bases, já que isto se correlaciona diretamente com a gravidade e sobrevida dos doentes.

O diagnóstico é realizado por teste genético de PCR, reação em cadeia de polimerase, que permite especificar o número de repetições de CAG nas amostras de DNA no sangue dos pacientes (WARNER, 1993). Como citado anteriormente, considera-se positivo para DH, pacientes com seqüências iguais e acima de 36 CAG (KREMER et al., 1994).

O diagnóstico molecular é importante para diferenciação de outras doenças neurodegenerativas que apresentam sintomas coreiformes similares, assim como em doenças que também apresentam como característica a expansão de trinucleotídeos.

Dessa forma, o teste genético pode ser indicado para pacientes sintomáticos e assintomáticos. Nos casos sintomáticos, é indicado para pacientes com sintomas neurológicos compatíveis com DH, com ou sem história familiar positiva. Já nos casos assintomáticos, é útil para pessoas que apresentam história familiar positiva

que queiram saber dos riscos de desenvolver a doença e fazer um planejamento familiar.

Segundo recomendações relativas ao uso do teste preditivo para a detecção da doença de Huntington - traçadas por um comitê formado por representantes da *International Huntington Association* (IHA) e da *World Federation Neurology* (WFN) – Grupo de Pesquisa em Coreia de Huntington - todos os indivíduos que desejam fazer o teste devem receber informações relevantes e atualizadas, além de aconselhamento e acompanhamento multidisciplinar para que possam decidir sobre sua realização. Portanto, o diagnóstico através da análise do DNA é um procedimento complexo, com uma variedade de implicações médicas, psicológicas e éticas envolvidas.

## 2.11 Tratamento

Não existe cura para a DH, no entanto, existem vários tratamentos capazes de reduzir a gravidade dos sintomas, e assim, aumentar a expectativa de vida dos doentes.

Os agentes depletadores e antagonistas dopaminérgicos têm sido o grupo farmacológico mais utilizado para o controle dos movimentos coreicos. Antidepressivos, antagonistas do glutamato, antiepilépticos e outros fármacos são utilizados na DH para tratamento sintomático (ADAM ; JANKOVIC ,2008).

A coréia é o sintoma motor mais evidente na DH e o seu tratamento tem sido alvo de inúmeros estudos comparativos. A Tetrabenazina (TBZ), aprovada em 2008 para comercialização pela Food and Drugs Administration (FDA), é um inibidor do transporte das monoaminas no cérebro, nomeadamente a dopamina, serotonina e noradrenalina, com mais efeito sobre a dopamina (FRANK, 2010). A aprovação foi baseada num único ensaio clínico com o uso de placebo, no qual a TBZ demonstrou uma redução significativa dos sintomas coreicos, embora também tenha sido associada com alterações do sono, aumento do risco de suicídio e interação medicamentosa com antidepressivos tricíclicos, os quais acentuam os efeitos adversos da TBZ (ONDO et al., 2002).

A dose inicial é de 25,5 mg por dia; máximo de dose diária de 100 mg, administrado em doses até três vezes por dia. Outros fármacos também podem ser usados para o tratamento da coreia como a amantadina e antipsicóticos (haloperidol, clozapina, risperidona). Estudos com a Amantadina, um antagonista do receptor ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), têm demonstrado supressão significativa da coreia, embora não haja resultados comprovados (VIDENOVIC, 2013).

A depressão na DH é tratada com medicamentos antidepressivos tricíclicos (imipramina, amitriplina), ou com inibidores seletivos de recaptação de serotonina – ISRS (fluoxetina, sertralina). Quando existem sintomas psicóticos, estes podem ser tratados com neurolepticos, mas a resposta nem sempre é satisfatória. Irritabilidade, ansiedade e alterações de humor são tratadas com benzodiazepínicos. (HADDAD; CUMMINGS, 1997).

Nenhuma terapêutica atrasa o curso natural da doença. No entanto, estão em desenvolvimento estratégias cujos alvos são outros receptores, além dos receptores dopaminérgicos, nomeadamente os receptores da adenosina e canabinoides. Substâncias com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias estão em experimentação. Em particular os canabinoides encontram-se em fase de investigação em várias doenças neurodegenerativas (FRANK; JANKOVIC, 2010).

A Estimulação Cerebral Profunda (Deep Brain Stimulation/DBS) está em fase experimental. A DBS tem como alvo o globo pálido interno (GPi) e foi praticado em 2004 num doente com DH. Os sintomas de coreia e distonia tiveram melhoria de acordo com frequência de estimulação. Por outro lado, a bradicinesia agravou com o aumento dessa frequência. Sendo assim, este procedimento não pode ser recomendado por não ser possível prever a sua eficácia a longo prazo (MORO et al., 2004).

A DH é uma doença neurodegenerativa que apresenta distúrbios muito complexos, por isso, o tratamento exige o emprego de abordagens terapêuticas abrangentes. É recomendado, além dos cuidados médicos, a utilização de fisioterapia, terapia ocupacional, acompanhamento fonoaudiológico, nutricional e psicoterápico, a fim de favorecer a independência dos doentes nas atividades diárias, bem como melhorar a sua qualidade de vida e de seus cuidadores.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Relacionar o diagnóstico molecular da DH com as manifestações clínicas da doença e analisar a expressão dos genes DNAH6, DYNLT1 e DCTN3 envolvidos no tráfego celular, cuja expressão está alterada em modelo animal de DH.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Realizar o diagnóstico qualitativo e quantitativo da DH por PCR.
- Relacionar o número de repetições CAG do alelo expandido com: a idade de início da manifestação da doença, os componentes da escala UHDRS, a gravidade dos sintomas da doença.
- Avaliar a gravidade do comprometimento motor, comportamental e funcional dos pacientes com DH.
- Investigar a expressão dos genes DNAH, DYNLT1 e DCTN3 nos pacientes com DH.
- Comparar a expressão dos genes DNAH, DYNLT1 e DCTN3 nos pacientes com as alterações observadas no modelo animal geneticamente modificado para DH.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Casuística**

Neste estudo, foram selecionados 25 pacientes de diversas famílias distribuídas pela Grande Vitória e cidades do interior do Estado que apresentavam sintomas compatíveis com a DH e eram acompanhados pela equipe médica do Ambulatório de Genética Clínica do Hospital Universitário Cassiano Antonio Moraes da UFES (HUCAM/UFES), Vitória (ES).

O diagnóstico clínico foi realizado por uma equipe de neurologistas, geneticistas, psicólogos e fisioterapeuta. Os indivíduos com sintomas clínicos compatíveis com a doença foram selecionados por meio de anamnese e histórico familiar positivo para a aplicação da Escala Unificada para Doença de Huntington (UHDRS). Os participantes avaliados apresentavam idades variadas e estágios clínicos diferentes, sendo necessário o auxílio de familiares na avaliação clínica da doença.

O grupo controle foi composto por 12 indivíduos saudáveis, sem histórico familiar da doença, com idade e sexo compatíveis com os pacientes em estudo.

Os participantes foram classificados em dois grupos:

- 1) Grupo de indivíduos saudáveis sem história familiar de DH (controle).
- 2) Grupo de pacientes com diagnóstico clínico de DH.

O presente projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UFES 145/2011.

### **4.2 Avaliação pela escala UHDRS**

Para diagnóstico clínico dos sinais e sintomas da DH foi utilizada a Escala Unificada para avaliação da Doença de Huntington (UHDRS). Esta escala é um instrumento padrão para investigação dos sintomas clínicos da doença e permite avaliar o estágio de gravidade em que cada paciente se encontra, bem como acompanhar a sua evolução.

Neste estudo, foram analisados os componentes da escala UHDRS, principalmente, os distúrbios motores, comportamentais, a capacidade funcional, a independência e o estágio de gravidade que o paciente se encontra.

O resultado da avaliação clínica nesta escala, realizada pela equipe médica, gerou um somatório de pontos para cada item avaliado.

A avaliação motora total quantifica o nível de comprometimento motor do paciente. É obtido pelo somatório de pontos de 31 itens que avaliam diferentes sinais motores, sendo eles: olhar de acompanhamento; início e velocidade do movimento sacádico (movimentos rápidos dos olhos, que mudam a direção do olhar); disartria; protusão da língua; batida dos dedos; pronação e supinação das mãos; lúria; rigidez; bradicinesia corporal; distonia; coreia; marcha e estabilidade postural. A pontuação varia entre 0 e 124, sendo proporcional ao maior comprometimento motor.

A avaliação comportamental e psiquiátrica da UHDRS inclui 28 itens que quantificam a gravidade e a frequência de vários sintomas comportamentais (depressão, baixa auto-estima, ansiedade, pensamentos suicidas, agressividade, irritabilidade, comportamentos compulsivos, obsessivos, alucinações, ilusões e apatia). A pontuação total varia entre 0-176, e os pontos mais altos indicam maior comprometimento comportamental.

A escala de avaliação funcional é preenchida através da informação do doente ou do seu acompanhante. Este consta de um questionário de 25 perguntas (25 pontos) que abrange tarefas da vida diária, desde a capacidade para manter profissão remunerada até as tarefas de higiene e alimentação executadas sem auxílio. Quanto maior a pontuação, melhor a sua capacidade funcional.

A escala de independência varia de 10% a 100% e determina o nível de independência do paciente de acordo com a necessidade de auxílio ou de cuidados especiais.

O estágio geral dos participantes é classificado de acordo com a escala de Shoulson e Fahn, que traduz o índice de capacidade funcional e varia entre 0 e 5. Este é avaliado conforme a capacidade do paciente sobre atividades básicas administrativas e diárias. Os pontos mais baixos 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).

Dessa forma a UHDRS é indispensável na investigação do diagnóstico clínico da doença, a fim de ajudar na avaliação da necessidade e eficácia de intervenções terapêuticas e sócio-econômicas (KLEMPÍR et al.,2006).

### **4.3 Amostra biológica**

A coleta de sangue dos participantes foi realizada em dois momentos no estudo.

Para diagnóstico molecular, a partir da extração do DNA, a coleta ocorreu entre setembro de 2013 e setembro de 2014. Para isso, foram coletados de todos os participantes 4mL de sangue venoso em tubos do sistema Vacuette® com anticoagulante EDTA. As amostras obtidas foram aliquotadas, identificadas e armazenadas a -20°C até o momento da extração do DNA no laboratório de Bioquímica Clínica da UFES.

Para a avaliação da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (qPCR), foram selecionados nove pacientes do grupo DH e sete participantes do grupo controle para coleta de sangue, realizada entre junho e julho de 2015. A dificuldade de acesso aos pacientes, decorrente de estágios avançados da doença, impossibilitou a coleta de sangue e limitou o tamanho da amostra.

Para extração do RNA, foram coletados 4 mL de sangue venoso em tubos do sistema Vacuette® com anticoagulante EDTA. As amostras foram transportadas refrigeradas até o Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental para extração do RNA de forma imediata. Parte das amostras de cada paciente foi armazenada em freezer a -80°C, após adição de Brazol® (LGC Biotecnologia).

### **4.4 Avaliação Clínica**

A avaliação clínica foi realizada com aplicação da escala UHDRS aos pacientes por médico neurologista e geneticista, com auxílio de fisioterapeuta e psicóloga, entre setembro de 2013 e setembro de 2014, no Ambulatório de Genética Clínica do Hospital Universitário Cassiano Antonio Moraes da UFES

(HUCAM/UFES), Vitória (ES), em ambiente reservado com garantia de privacidade em todas as respostas.

#### **4.5 Diagnóstico molecular para DH**

O teste genético para confirmação da presença da proteína htt mutante foi realizado por reação em cadeia da polimerase (PCR), além de quantificação do número de glutaminas por seqüenciamento de DNA.

Foram coletadas, de cada participante do estudo, amostras de 4 mL de sangue venoso para serem utilizadas para a extração de DNA. Parte das amostras de cada paciente foi encaminhada para laboratório de apoio Geneticenter Ltda (Belo Horizonte/MG) a fim de realizar o seqüenciamento genético.

##### **4.5.1 Extração de DNA nas amostras de sangue**

O DNA genômico foi extraído com o kit “Wizard Genomic DNA Purification” (Promega). Uma alíquota das amostras de sangue foi transferida para um tubo de 1,5mL estéril e incubada com uma solução de lise de hemácias durante 10 minutos a temperatura ambiente. Após a lise das células vermelhas, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm durante 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de leucócitos foi ressuscitado. A solução de lise celular foi adicionada e, posteriormente, adicionou-se a solução de precipitação de proteínas. O material foi, em seguida, centrifugado a 14.000 rpm durante 3 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um tubo contendo isopropanol. A solução contendo o DNA foi centrifugada a 14.000 rpm durante 1 minuto, o isopropanol foi descartado, 1mL de etanol 70% foi adicionado para lavar o precipitado de DNA, e centrifugou-se novamente. O precipitado de DNA foi re-hidratado com 20 µL solução de hidratação (Tris 10 mM/ EDTA 0,1 mM). O grau de pureza das amostras foi medido em NanoDrop (A260/A280) e a análise posterior foi feita em gel de poliacrilamida a 8%.

## 4.5.2 Amplificação da expansão CAG pela técnica de PCR

O DNA extraído foi submetido inicialmente à análise da presença da htt mutante através da técnica de PCR para amplificação da expansão de CAG. As condições de amplificação, como o número de ciclos, concentração de reagentes e temperatura de anelamento foram padronizados para cada reação com o objetivo de se obter um bom sinal de amplificação com o mínimo de inespecificidade

Para isso, foram utilizados dois tipos de técnicas distintas de PCR: PCR alelo específica (WARNER et al, 1993; CULJKOVICK., et al,1997) e Nested PCR (DRURY., et al 2001). A primeira técnica citada foi empregada em duas reações de amplificação distintas e a técnica Nested PCR, foi utilizada para outra amplificação, com intuito de melhorar a especificidade.

Para as duas técnicas de PCR, foi utilizado o termociclador modelo S1000 ThermalCycler da marca BIO-RAD, e os reagentes foram: oligonucleotídeos (Invitrogen®), desoxirribonucleotídeos (Promega®), tampão (15 mM de MgCl<sub>2</sub>, 500 mM de KCl, 100 mM de Tris HCl pH 8,4 e 1% de TritonX-100) e Taq polimerase (Promega®).

### 4.5.2.1 PCR alelo específica

A PCR alelo específica foi utilizada para primeira reação de PCR seguindo as condições padronizadas pelo protocolo de Warner e colaboradores (1993) (quadro1). Para tal, foram empregados os iniciadores HD1 e HD3 (quadro 3).

**Quadro 1 – Condições de padronização da 1ª reação da PCR alelo específica.**

Reagentes	Concentração em estoque	Concentração em uso 1º PCR
Tampão	5X(15mM MgCl <sub>2</sub> )	1X
dNTP	2mM	0,2mM
HD1	10µM	0,5µM
HD3	10µM	0,5µM
Taq polimerase	5µ/µL	1U
DNA	100ng/µL (média)	2µL
DMSO	-	2µL
Água q.s.p.	-	20µL

Para a segunda reação de PCR, foi utilizada a técnica de PCR alelo específico utilizando as condições padronizadas por protocolo de Culjkovic e cols (1997) (quadro 2). Para tal, foram empregados os iniciadores HD1 e HDRnew (quadro 3).

**Quadro 2 – Condições de padronização da 2ª reação da PCR alelo específica.**

Reagentes	Concentração em estoque	Concentração em uso 1º PCR
Tampão	5X(15mM MgCl <sub>2</sub> )	1X
dNTP	2mM	0,2mM
HD1	10µM	0,08µM
HDRnew	10µM	0,08µM
Taq polimerase	5µ/µL	1U
DNA	100ng/µL (média)	2µL
DMSO	-	2,5µL
Água q.s.p.	-	25µL

**Quadro 3 – Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a 1ª e 2ª reação da PCR alelo específica.**

Iniciadores	Seqüência
<b>HD1 (oligo senso)<sup>1</sup></b>	5' TGA AGG CCT TCG AGT CCC TCA AGT CCT CC 3'
<b>HD3 (oligo antisenso)<sup>1</sup></b>	5' GGC GGT GGC GGC TGT TGC TGC TGC TGC TGC 3'
<b>HDRnew (oligoantisenso)<sup>2</sup></b>	5' CAG CAG CGG CTG TGC CTG 3'

<sup>1</sup> Warner, J.P., et al (1993) <sup>2</sup> Culjkovic, B., et al (1997)

**Quadro 4 – Programa utilizado no termociclador para a 1ª e 2ª PCR – alelo específica.**

Etapas	1ª reação de PCR	2ª reação de PCR
Desnaturação prévia	94°C - 4 min	94°C - 5 min
desnaturação	94°C – 30s	94°C – 1min
anelamento	68°C – 30s	60°C – 1min
extensão	72°C – 45s	72°C – 2min
Nº de ciclos	35 ciclos	35 ciclos
Extensão final	72°C – 10min	72°C – 10min

#### 4.5.2.2 Nested PCR

O Nested PCR foi utilizado numa terceira reação de PCR para aumentar a sensibilidade e especificidade do método, visando melhor eficiência do resultado. Nesta técnica emprega-se uma segunda etapa de amplificação com um par de primers internos aos outros utilizados na primeira etapa. As condições da reação foram padronizadas segundo protocolo de Drury e cols (2001) (quadro 5). A 1<sup>o</sup> etapa foi realizada com os primers HD3F e HD2R e a 2<sup>o</sup> etapa com os primers HD1F e HD2R (Drury, K.C., et al, 2001) (quadro 6). Os programas das reações das 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> etapas estão especificadas no quadro 7.

**Quadro 5 – Condições padronizadas para a 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> reação de PCR Nested.**

Reagentes	Concentração em estoque	Nested PCR	
		1 <sup>o</sup> etapa	2 <sup>o</sup> etapa
Tampão	5X(7,5mM MgCl <sub>2</sub> )	1X	1X
dNTP	2mM	0,2mM	0,2,mM
HD3F	10µM	0,16µM	-
HD2R	10µM	0,16µM	0,12 µM
HD1F	10µM	-	0,12 µM
Taq polimerase	5U/µL	1U	0.5 U
DNA	100ng/µL (média)	2µL	-
PCR (etapa1)	-	-	2,5µL
Água q.s.p.	-	25µL	25 µL

**Quadro 6 – Seqüência dos iniciadores utilizados na 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> reação de Nested PCR.**

Iniciadores	Sequencia
HD3F <sup>1</sup> (oligo senso)	5' TTT TAC CTG CGG CCC AGA 3'
HD2R <sup>1</sup> (oligoantisenso)	5' GGC TGA GGA AGC TGA GGA 3'
HD1F <sup>1</sup> (oligosenso)	5' ACC CTG GAA AAG CTG ATG 3'

<sup>1</sup> Drury, K.C., et al (2001)

**Quadro 7 – Programa utilizado no termociclador para a 1º e 2º reação da Nested PCR.**

<b>Etapas</b>	<b>1º reação de PCR</b>	<b>2º reação de PCR</b>
Desnaturação prévia	98°C - 3min	98°C - 3min
desnaturação	98°C – 30s	98°C – 30s
anelamento	57,2°C – 45s	57,2°C – 45s
extensão	72°C – 90s	72°C – 90s
Nº de ciclos	30 ciclos	30 ciclos
Extensão final	72°C – 12min	72°C – 12min

Os produtos da reação de PCR alelo específica (figura 1) e Nested (figura 2) foram separados por eletroforese através de um gel de poliacrilamida a 8% corado, posteriormente, pela prata para visualização do produto amplificado. Os tamanhos dos alelos foram determinados pela comparação da migração com padrão de 100pb. De acordo com protocolo de Warner (1993) referente à figura 1, pacientes com fragmentos de tamanho compreendidos entre 80pb a 143pb (11 a 32 CAG) são classificados como normais para a DH e quando iguais ou acima de 173pb (>40 CAG) são considerados afetados. No protocolo de Drury e cols (2001), sobre a Nested PCR (figura 2), considera-se positivo quando o produto amplificado apresenta fragmento maior que 162pb.

#### **4.5.3 Sequenciamento genético**

As amostras de sangue dos 25 pacientes foram encaminhadas para o laboratório de apoio Geneticenter Ltda (Belo Horizonte/MG) para confirmação genética por seqüenciamento através de análise de fragmentos por eletroforese capilar. Os resultados determinaram o número de repetições de glutamina de cada alelo para os dois grupos de participantes.

## 4.6 Avaliação da expressão gênica

Foi feita extração de RNA a partir das amostras de sangue em EDTA de parte dos pacientes do grupo DH e do grupo controle. A qPCR foi realizada a fim de quantificar os níveis de mRNA dos genes seguintes: Dineína de cadeia pesada axonemal 6 (DNAH6), Dineína de cadeia leve Tctex-tipo 1 (DYNTL1) e Dinactina3 (DCTN3).

### 4.6.1 Extração de RNA de amostras de sangue

Para a extração do RNA total a partir das amostras de sangue, foi utilizada solução monofásica contendo fenol e guanidina isotiocianeto (Brazol®, LGC Biotecnologia). As amostras de sangue venoso em EDTA foram transportadas refrigeradas rapidamente para o laboratório para realizar a extração. O ambiente de trabalho foi limpo com solução descontaminante de RNAses (RNase ZAP, Ambion) e também foram utilizados tubos, ponteiras e soluções livres de RNAses.

Amostra de 100  $\mu$ L de sangue total foi adicionada em tubo estéril de 1,5 mL contendo 1 mL de Brazol®. A homogeneização foi realizada agitando em vórtex durante 30 segundos, o que determina lise celular, porém mantendo o RNA íntegro. Adicionou-se 200  $\mu$ L de clorofórmio, agitou-se novamente no vórtex por 15 segundos e depois centrifugou-se (12.000 x g, 15 min, 4°C) para separar as fases aquosa e orgânica. O RNA permaneceu exclusivamente na fase aquosa e esta foi transferida para outro tubo de 1,5 mL contendo 500  $\mu$ L de isopropanol, responsável pela precipitação do RNA. Após incubação à temperatura ambiente por 10 min, realizou-se nova centrifugação (12.000 x g, 10 min, 4°C). Desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de etanol a 75% para lavagem do precipitado (preparado com água DEPC a 0,01%). Em seguida, centrifugou-se a 7.500 x g por 5 min, 4°C. O sobrenadante foi removido com cuidado e seco a 60°C por 10 minutos. O precipitado de RNA foi ressuspenso em 30  $\mu$ L de água livre de RNase, isto é, água tratada com dietilpirocarboneto – DEPC (Sigma, MO, EUA).

A concentração do RNA extraído foi verificada utilizando o equipamento NanoDrop™ (ThermoScientific, Wilmington, USA). Para a verificação da pureza do

RNA extraído calcula-se a razão entre a absorvância medida a 260 nm e a 280 nm. Valor entre 1,8 e 2,0 foi considerado grau de pureza satisfatória.

#### **4.6.2 Eletroforese em gel de agarose**

As amostras do RNA extraído foram submetidas a uma eletroforese em gel desnaturante de agarose para verificar a qualidade deste RNA. O gel de agarose foi preparado a 1% em água previamente tratada com DEPC e autoclavada, adicionado de 9 mL de formaldeído e 5mL de tampão MOPS 10X (MOPS[3-(Nmorpholino) propanesulfonic acid] 0,2 M, acetato de sódio 0,05 M, EDTA 0,01 M; pH 5,5-7,0). As amostras foram homogeneizadas com 2 µL de MOPS 10X, 4 µL de formaldeído, 10 µL de formamida, 0,5 µL de brometo de etídeo a 10%, aquecidas a 80°C por 10 minutos e resfriadas no gelo. As mesmas foram homogeneizadas com tampão de amostra contendo 0,25% azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol e 30% de glicerol em água, e então aplicadas no gel. Para a corrida, 10X MOPS foi diluído para 1X MOPS e utilizado como tampão de corrida. As amostras correram a 100V por aproximadamente 70 minutos e as bandas foram observadas em um transiluminador UV.

#### **4.6.3 Síntese de cDNA**

A síntese de cDNA foi realizada com o kit iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad®, CA, USA) usando o equipamento S1000 Thermal Cycler (Biorad, CA, USA). As condições da reação foram as seguintes: 25°C por 5 min., 42°C por 30min., 85°C por 5 min.

#### **4.6.4 Desenho dos iniciadores para qPCR**

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para  $\beta$ -actina (ACTB) - gene normalizador – e para DNAH6, DCTN3, DYNLT1 - genes alvos - foram desenhados a partir da seqüência de RNAm do gene em questão contidos no site

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>, escolhendo a região de interesse para confecção dos iniciadores. A partir disso foi feito o desenho pelo Programa Integrated DNA Technologies – IDT (<https://www.idtdna.com/Primerquest>) e o alinhamento com outras sequências foi verificada no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.

**Tabela 1 – Sequência dos iniciadores para avaliação da expressão gênica em qPCR.**

GENE	Acesso no banco de genes	Iniciadores (5'- 3')	Tamanho fragmento(pb)
<b>ACTB</b>	BC016045	F: TCCTCACCCCTGAAGTACCC R: CACACGCAGCTCATTGTAGA	98
<b>DNAH6</b>	NM_001370	F: TGCCACATCATCTACTCAGTTT R: ACCAGTATGTGGCAGTTTAGG	115
<b>DCTN3</b>	NM_001281425	F: AGAGGGAGAGGGTGAAGATT R: CAGCTTAGAGGCATCAGGTATG	104
<b>DYNLT1</b>	NM_006519	F: GTGCCTTCGGACTGTCTATTT R: ATTCATGGCTGGTGGTTAGAG	90

\* ACTB ( $\beta$ -actina); DNAH6 (Dineína de cadeia pesada axonemal 6); DYNLT1 (Dineína de cadeia leve Tctex-tipo); DCTN3 (Dinactina3)

#### 4.6.5 Reação de PCR quantitativo em tempo real

As amostras de cDNA obtidas foram submetidas à reação qPCR utilizando o equipamento Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, com o kit SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). As reações foram preparadas em um volume total de 12 $\mu$ L contendo 5  $\mu$ L de SYBR Green Master Mix, 3,5  $\mu$ L de água purificada, 0,5 $\mu$ L de cada iniciador a 10 $\mu$ M e 0,5  $\mu$ L de cDNA. Foram realizados 45 ciclos após a desnaturação inicial (95°C, 2 minutos) de acordo com os seguintes parâmetros: 95°C (desnaturação) por 15s; 60°C (anelamento) por 30s e 72°C (amplificação) por 30s. Para garantir a qualidade da reação, as amostras foram preparadas em triplicata e para cada experimento incluiu-se uma reação sem molde

como controle negativo. Além disso, a ausência de contaminantes de DNA foi avaliada utilizando-se amostras RT-negativas e pela análise da curva de melting dos produtos amplificados, que foi feita resfriando-se as amostras a 60°C e, em seguida, aumentando-se a temperatura para 95°C a 0,1°C/s. A quantificação relativa da expressão gênica foi feita pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  utilizando o gene da  $\beta$ -actina para normalização dos dados. Os primers utilizados tiveram a eficiência de amplificação avaliada, apresentaram desempenho satisfatório, e estão descritos na tabela 1.

#### 4.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi feita através do software GraphPadPrism®, versão 5.0. O estudo contou com variáveis quantitativas e qualitativas (categóricas). Antes da comparação entre os grupos e para verificar quais variáveis quantitativas possuíam distribuição normal foi realizado o teste de Shapiro Wilk.

Para as variáveis que apresentaram distribuição fora da normalidade, a comparação entre mais de dois grupos foi realizada com teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de múltipla comparação de Dunn post hoc. Quando as variáveis quantitativas não seguiram a normalidade e eram comparadas para dois grupos, foi realizado o teste não paramétrico de Mann Whitney.

A investigação da correlação entre os parâmetros estudados foi realizada através da correlação de Spearman para as variáveis não paramétricas e Pearson para as variáveis normais.

Para análise descritiva, as variáveis contínuas foram descritas nos seus valores mínimos, médios, medianos, máximos e desvio padrão.

Para análise dos resultados do qPCR, a média e o erro padrão foram calculados a partir de triplicatas técnicas e analisados pelo teste *t* de *Student* não pareado. Foram consideradas como diferenças significativas valores de  $p < 0,05$  com intervalos de confiança de 95%.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização dos pacientes

Neste estudo, foram selecionados pela equipe médica, 25 pacientes com características clínicas de DH (grupo 2). A tabela 2 representa a caracterização sociodemográfica dos participantes. Destes, 15 (60%) pacientes pertencem ao sexo feminino e 10 (40%) ao sexo masculino. Possuem uma média de 43 anos de idade com etnia predominante europeu latino (48%) e a maioria residente na Grande Vitória (48%).

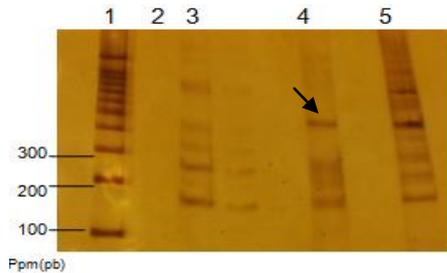
**Tabela 2 - Características sociodemográficas dos participantes do grupo 2.**

Variável	Categoria	Grupo DH
Gênero (n, %)	Feminino	15 (60%)
	Masculino	10 (40%)
Idade (M ± DP)	-	43,28 ± 14,36
Idade por faixa etária (n, %)	0 A 20 ANOS	03 (12%)
	21 A 40 ANOS	08 (32%)
	41 A 60 ANOS	11 (44%)
	> De 60 ANOS	03 (12%)
Etnia (n, %)	Europeu latino	12 (48,0%)
	europeu não latino	09 (36%)
	africano	04 (16%)
Distribuição Geográfica (n, %)	Grande Vitória	12(48%)
	Aracruz	3 (12%)
	Linhares	1 (4%)
	Ibiraçu	4 (16%)
	Santa Tereza	1 (4%)
	Cachoeiro de Itapemirim	3 (12%)
	Domingos Martins	1 (4%)

### 5.2 Diagnóstico molecular para DH

A investigação da presença do alelo mutante foi realizada nos 25 pacientes encaminhadas para o estudo. A Figura 3 ilustra o resultado da eletroforese do

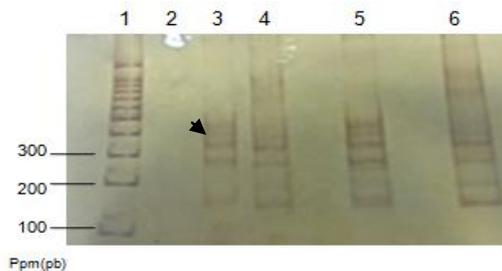
produto da PCR alelo específica - Warner, J.P., et al (1993) ,Culjkovic, B., et al (1997) - realizada para diagnóstico da mutação no gene de um paciente do grupo 2, sendo um indivíduo já afetado pela DH (canaleta 4), cujo DNA foi utilizado como controle positivo da reação.



Legenda : Canaletas: 1: padrão de peso molecular; 2: branco; 3: controle negativo; 4: controle positivo; 5 : portador da mutação.

**Figura 3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção do alelo mutante no gene *IT15* dos pacientes do grupo 2, através da técnica de PCR alelo específico.**

A Figura 4 ilustra o resultado do teste molecular da Nested PCR - Drury,K.C., et al (2001) - realizada em dois pacientes do estudo, sendo um indivíduo controle positivo para DH (canaleta 3).



Legenda: Canaletas: 1: padrão de peso molecular; 2: branco; 3: controle positivo; 4: controle negativo; 5 e 6: pacientes suspeitos da mutação.

**Figura 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção do mutante no gene *IT15* dos pacientes do grupo 2, através da técnica de Nested PCR.**

Amostras de sangue dos pacientes com PCR positiva para htt mutante, bem como pacientes com resultado duvidoso na visualização em eletroforese, foram encaminhados para o laboratório Geneticenter Ltda para quantificação do número de repetições CAG pela técnica de análise de fragmentos através de eletroforese capilar.

Em dezessete (68%) pacientes foi identificada a expansão de CAG no gene *IT15* confirmando o diagnóstico de DH. Seis pacientes apresentaram número de repetições CAG normais, suspeitos de coréia benigna, e em dois pacientes não foi possível determinar o resultado. Já nas amostras dos pacientes controles (grupo 1), observou-se um participante com alelo de 28 repetições de CAG, que determina um alelo intermediário, não afetado, mas com potencial expansão nas próximas gerações.

**Tabela 3: Distribuição do resultado do seqüenciamento gênico do alelo normal e expandido nos pacientes do grupo 2.**

Pacientes do grupo DH	Repetição CAG do alelo expandido	Repetição CAG do alelo normal
1	-	-
2	-	-
3	41	27
4	40	12
5	17	17
6	44	13
7	45	17
8	16	17
9	16	*
10	43	15
11	15	*
12	15	14
13	39	17
14	45	21
15	16	17
16	47	13
17	40	15
18	42	21
19	41	17
20	44	16
21	40	13
22	42	16
23	43	20
24	39	21
25	41	22

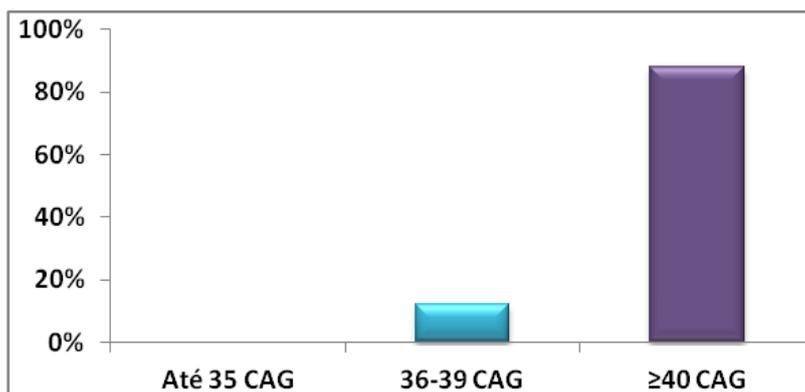
**Grupo DH:** Paciente 1 e 2 – não foi possível determinar o número de CAG. Paciente 5,8,9,11,12,15: suspeitos de coréia benigna. \* Presença de homozigose para os dois alelos ou alelo nulo. Expansões acima de 240 repetições não são detectáveis.

**Tabela 4: Distribuição do resultado do seqüenciamento gênico dos dois alelos nos participantes do grupo controle.**

Pacientes do grupo controle	Repetição CAG do primeiro alelo	Repetição CAG do segundo alelo
1	21	16
2	16	13
3	14	*
4	14	*
5	18	14
6	15	*
7	14	15
8	*	*
9	23	20
10	28	15
11	19	18
12	17	16

**Grupo controle:** \* Presença de homozigose para os dois alelos ou alelo nulo. Expansões acima de 240 repetições não são detectáveis.

De acordo com o número de repetições CAG, os pacientes são classificados em normais, intermediários e afetados - com penetrância reduzida ou completa. Dos 17 pacientes confirmados geneticamente e, portanto, afetados pela doença de Huntington, observou-se que aproximadamente 12% (2) apresentam repetições de CAG entre 36 e 39 (penetrância reduzida). No entanto, a maioria dos pacientes, 88% (15), apresentam repetições acima de 40 CAG (penetrância completa), com sintomas clássicos bem definidos (figura 5).



**Figura 5 - Classificação dos alelos de acordo com o número de repetições CAG nos pacientes com DH.**

### 5.3 Avaliação genética e clínica dos pacientes com DH

A Tabela 5 mostra a distribuição dos pacientes confirmados com DH em relação ao alelo mutante e normal, gênero, idade do 1º sintoma, idade atual, etnia e transmissão genética.

**Tabela 5 - Caracterização genética, étnica e clínica dos pacientes com DH.**

Paciente	Sexo	Etnia	idade 1º sintoma	Idade atual	alelo expandido	alelo normal	Transmissão
1	F	européu latino	45	51	40	12	materna
2	M	européu não latino	59	69	41	22	paterna
3	F	africano	30	39	43	20	paterna
4	M	africano	43	47	39	21	paterna
5	F	africano	29	38	47	13	paterna
6	M	africano	47	50	40	15	paterna
7	M	africano	33	37	43	15	paterna
8	F	africano	40	47	40	13	materna
9	M	africano	36	40	45	21	desconhecido
10	M	européu latino	40	47	41	27	paterna
11	F	européu não latino	46	54	41	17	materna
12	F	européu não latino	36	39	44	16	materna
13	F	européu latino	56	66	42	16	desconhecido
14	M	européu não latino	37	47	42	21	materna
15	M	européu latino	36	43	44	13	paterna
16	M	européu latino	47	56	39	17	paterna
17	F	européu latino	35	45	45	17	paterna
Média			40,9	47,9	42,11	17,41	
			±8,40	±9,22	±2,31	±4,04	

O número de expansões nos alelos variou de 39 a 47 repetições de CAG (média de 42,11 unidades CAG) e dos alelos normais de 12 a 27 unidades CAG (média = 17,4 CAG). Da população afetada, 53% são do sexo masculino e 47% feminino e a etnia predominante foi africana com 41,2%, sendo europeu latino 35,2% e europeu não latino 23,5%.

A idade atual variou de 37-69 anos (média de 47,9 anos) e a idade do 1º sintoma de 29 a 59 anos (média de 41 anos). A transmissão foi predominante paterna com 58,8% e a materna 41,1%. Dois pacientes não souberam responder a herança genética familiar da doença. Todos pacientes confirmados com DH tiveram início dos sintomas após os 20 anos de idade e, portanto, apresentam a forma tardia da doença.

Os componentes da escala UHDRS foram relacionados estatisticamente entre si, assim como os outros dados clínicos citados, a fim de avaliar a relação destes com os pacientes neste estudo e contribuir para o esclarecimento e futuros tratamentos da doença. Consideramos diferença significativa para  $p < 0,05$ .

Na figura 6 observa-se uma correlação negativa significativa ( $p=0,005$ ,  $r= -0,64$ ,  $R= 41,7\%$ ) entre o número de repetições CAG no alelo maior e a idade de aparecimento do 1º sintoma. O aumento número de repetições CAG foi associado a uma idade menor de aparecimento dos primeiros sintomas. Como mostrado na tabela 5, entre os dezessete pacientes confirmados, o paciente que apresentou o início dos sintomas mais precoce (29 anos), possui o maior número de repetições CAG no alelo mutante.

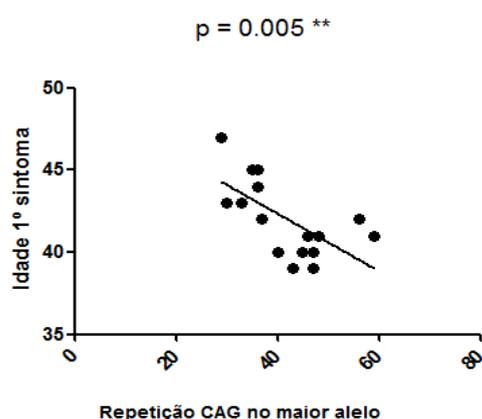


Figura 6 – Gráfico de dispersão correspondente a correlação ( $p < 0,05$ ) entre a idade do 1º sintoma nos pacientes com DH e o número repetições CAG no maior alelo nos indivíduos doentes.

No entanto, não se observa diferença estatisticamente significativa (teste de Pearson:  $p=0,24$ ) entre o número de repetições CAG no alelo normal e a idade de aparecimento do primeiro sintoma (Figura 7).

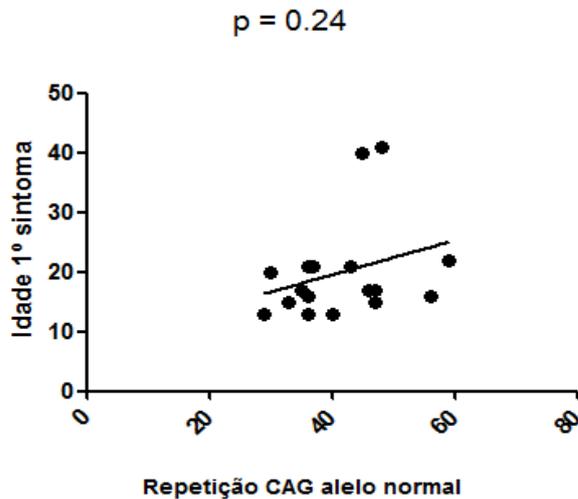
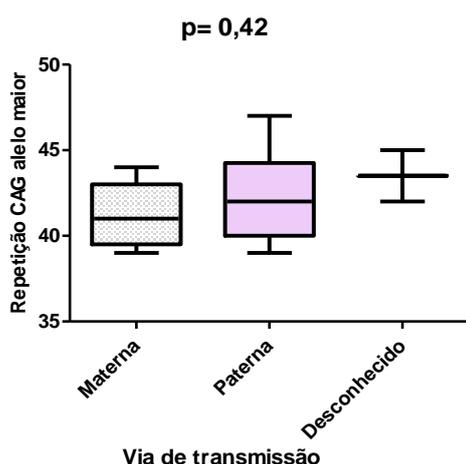


Figura 7 - Gráfico de dispersão correspondente a correlação não significativa entre a idade do 1º sintoma nos pacientes com DH e o número repetições CAG no alelo normal nos indivíduos doentes.

Como observado na tabela 5, a transmissão por via paterna foi encontrada em 10 (58,8%) pacientes e a materna em 5 (41,1%). Em 2 indivíduos (11,7%) não foi possível determinar a via de transmissão apesar de conhecidos os progenitores. Neste estudo, não foi observada diferença em relação ao número de repetições do trinucleótido CAG do alelo maior e a via de transmissão (teste de Kruskal-Wallis:  $p=0,42$ ), como está representado na Figura 8.



**Figura 8 - Gráficos Box-plot correspondente ao número de repetições CAG do alelo maior de acordo com a via de transmissão genética.**

Os pacientes com DH confirmados por seqüenciamento molecular foram selecionados para avaliação por uma escala específica que verifica o grau da doença (UHDRS). Por meio de um somatório de pontos de cada componente (motor, comportamental, capacidade funcional e independência) foi feita a análise descritiva da pontuação para cada item em relação aos pacientes avaliados, a fim de saber o nível da gravidade da doença nestes pacientes.

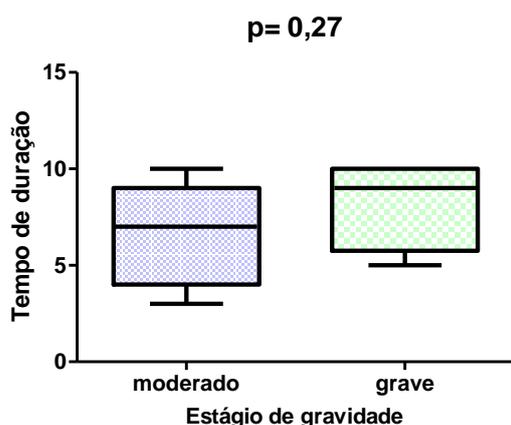
A tabela 6 representa a descrição total da pontuação dos pacientes com DH avaliados pela escala UHDRS para cada item. O tempo de duração da doença nestes pacientes variou de 3 a 10 anos, com média de 7 anos de aparecimento dos primeiros sintomas. Verifica-se que o valor médio do desempenho motor é de 58,8 pontos (0-124), o que traduz um comprometimento motor de 47,4% em relação a pontuação máxima. Quanto à capacidade funcional, o valor médio dos pontos apresentados neste estudo é de 10,05, sendo o total desta escala 25.

**Tabela 6 - Análise descritiva da pontuação dos componentes da escala UHDRS nos pacientes com DH.**

Avaliação Global da escala UHDRS nos pacientes com DH						
	Motor	Comportamental	Funcional	TFC	Independência	Duração doença (anos)
<b>MINIMO</b>	32	6	0	0	10	3
<b>MEDIANA</b>	54	15,5	11	4,5	65	7
<b>MÁXIMO</b>	85	132	23	13	80	10
<b>MÉDIA</b>	<b>58,8</b>	<b>25,05</b>	<b>10,05</b>	<b>4,5</b>	<b>57</b>	<b>7</b>
<b>DEV. PADRÃO</b>	18,81	28,05	7,19	3,50	22,03	2,62

O estágio da gravidade dos pacientes, obtidos por meio do índice de capacidade funcional total na escala UHDRS - divididos em leve, moderado e grave - foi correlacionado com o tempo de duração da doença (figura 9), a avaliação funcional (figura 10) e o componente motor (figura 11) do paciente. Não houve nenhum paciente em estágio leve, por isso relacionou-se apenas os estágios moderado e grave.

Verifica-se não existir diferença significativa ( $p=0,27$ ) quanto ao tempo de duração da doença e o estágio de gravidade nos pacientes deste estudo (figura 10).



**Figura 9 – Gráfico Box-plot correspondente ao tempo de duração da doença e o estágio de gravidade. Teste de Mann-Whitney estatisticamente não significativo ( $p>0,05$ ).**

A capacidade funcional dos pacientes avaliados na escala UHDRS está diretamente relacionada com a gravidade da doença, como mostrado na figura 11. Como esperado, existe uma diferença estatística significativa ( $p=0,006$ ,  $U=1,5$ ).

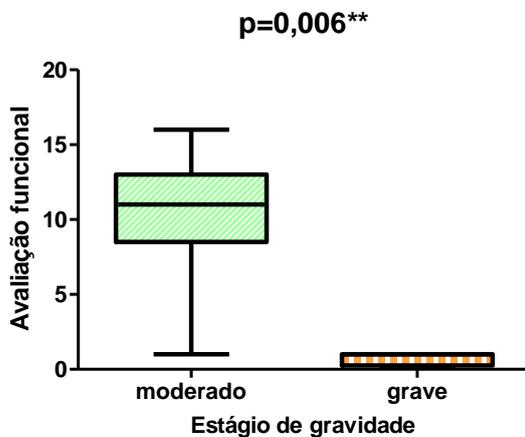


Figura 10 – Gráfico Box-plot correspondente a avaliação funcional de acordo com o estágio de gravidade. Teste de Mann-Whitney com diferença estatística para  $p < 0,05$

A deterioração motora é o sintoma mais clássico na DH. O somatório de pontos do componente motor variou de 32 a 85 pontos. A figura 11 mostra uma relação significativa ( $p=0,005$ ,  $U=7,0$ ) referente ao comprometimento motor e a gravidade da doença.

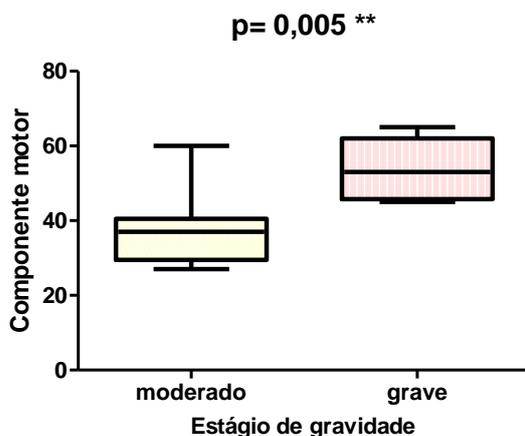


Figura 11 – Gráfico Box-plot correspondente ao componente motor da escala UHDRS e o estágio de gravidade. Teste de Mann-Whitney com diferença estatística para  $p < 0,05$ .

Com relação às variações de sintomas da função motora, avaliada pela escala UHDRS, o grupo de pacientes com DH em estágio moderado obteve média de 48,9 pontos totais (32-55), representando 39,43% de alteração motora. O grupo DH em estágio grave obteve 73,7 pontos (65-85) no total de 124 pontos possíveis, que representa 59,43%. No grupo moderado as tarefas motoras finas foram as mais prejudicadas (68,5%). No grupo grave a alteração foi maior na função relacionada à marcha (96,6%) e nas tarefas motoras finas (96,5%). A coréia se manifestou com maior frequência no grupo moderado (42,14%) do que no grupo grave (30,7%). Sintomas parkinsonianos foram menos frequentes. Não houve sintoma de distonia nos dois grupos. A tabela 7 mostra o desempenho motor total distribuído nas sete categorias proposta pela escala UHDRS.

**Tabela 7 – Desempenho dos pacientes com DH em estágio moderado e grave na avaliação motora da UHDRS.**

UHDRS	Grupo DH moderado		Grupo DH grave (média)	
	(média)	%	(média)	%
Função oculomotora	12,6/24	52,5	20/24	83,3
Tarefas motoras finas	13,7/20	68,5	19,3/20	96,5
Movimentos orolinguais	3,3/8	41,25	6,6/8	82,5
Coréia	11,8/28	42,14	8,6/28	30,7
Distonia	0/20	0	0/20	0
Parkinsonismo	3,4/12	28,3	7,6/12	63,3
Função relacionada à marcha	4,11/12	34,25	11,6/12	96,6
<b>Total</b>	<b>48,9/124</b>	<b>39,43</b>	<b>73,7/124</b>	<b>59,43</b>

Registra-se a existência de uma correlação negativa e estatisticamente significativa ( $p=0,004$ ;  $r= -0,65$ ) entre o componente motor total e a independência de acordo com a escala UHDRS. Dessa forma, um aumento da pontuação no componente motor (alterações motoras) corresponde a uma acentuada diminuição no grau de independência (figura12).

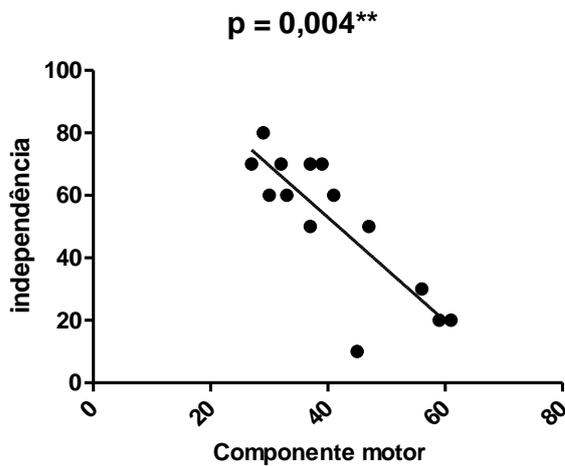


Figura 12 – Gráfico de dispersão correspondente à correlação estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre o componente motor da escala UHDRS e a independência dos pacientes.

Além disso, foram também correlacionados o tamanho da repetição CAG do alelo expandido e os outros componentes da escala UHDRS. Não foi observada diferença estatística entre o alelo expandido CAG e o componente motor ( $p=0,5$ ), a capacidade funcional ( $p=0,08$ ) e a avaliação comportamental ( $p=0,96$ ). Apenas a relação entre a repetição CAG do alelo expandido e a independência foi estatisticamente significativa ( $p=0,02$ ).

A escala de independência varia entre 10 e 100% e está relacionada com o agravamento dos sintomas e a necessidade de cuidados básicos ou especiais. Foi observada correlação negativa e estatisticamente significativa ( $p=0,02$ ,  $r=-0,53$ ,  $R=28\%$ ) entre a repetição CAG do alelo maior e a independência do paciente. Dessa forma, quanto maior o tamanho do alelo expandido CAG, maior será o agravamento da doença, logo menor será a independência do paciente (figura 13).

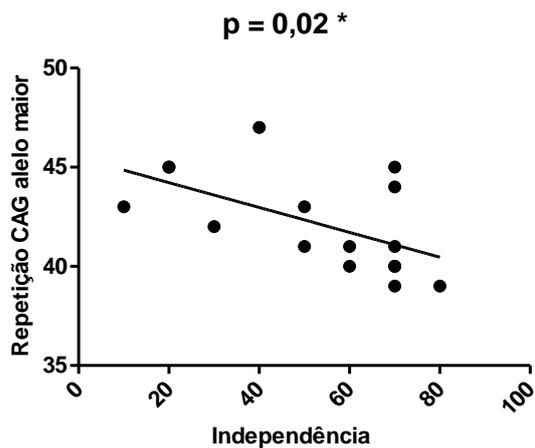
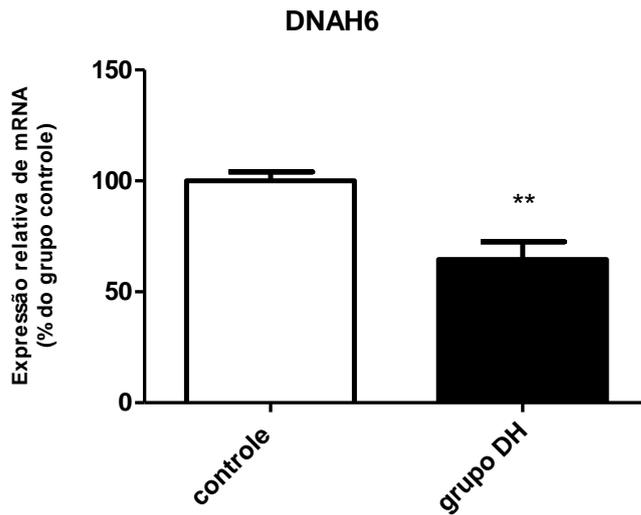


Figura 13 - Gráfico de dispersão correspondente a correlação estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre a repetição CAG do alelo maior e a independência dos pacientes.

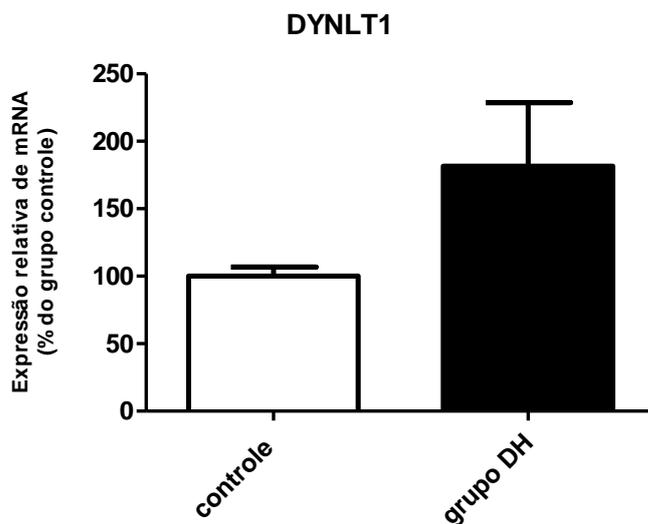
#### 5.4 Avaliação da expressão gênica em pacientes com DH

A expressão gênica relativa foi avaliada por qPCR a partir do sangue de pacientes diagnosticados com a DH para avaliar possíveis alterações transcricionais compatíveis com o encontrado em estudo anterior (RIBEIRO et al., 2013) em modelos de camundongos geneticamente modificados para DH.

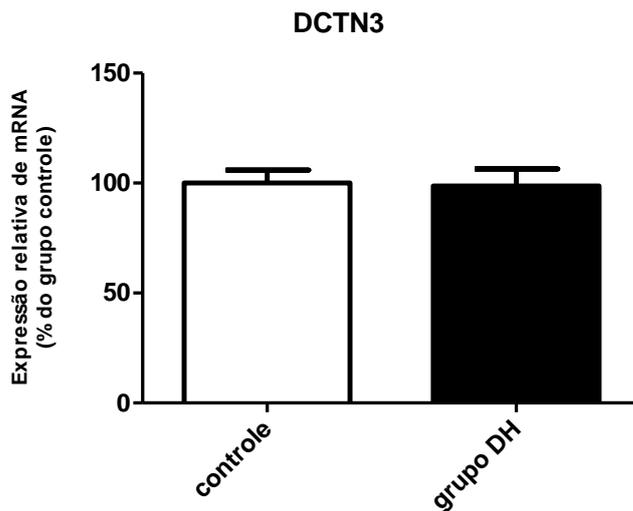
Com relação à expressão dos genes DNAH6, DYNTL1 e DCTN3 em pacientes com a DH, observou-se uma diminuição significativa na expressão de DNAH6 ( $p = 0,0025$ ) em relação ao grupo controle (Figura 14). Não houve alteração significativa na expressão gênica de DYNTL1 ( $p = 0,08$ ) (Figura 15), assim como para o gene DCTN3 ( $p = 0,41$ ), nos pacientes com DH quando comparado ao grupo controle (Figura 16).



**Figura 14.** Expressão relativa de mRNA do gene DNAH6, normalizada com o gene da  $\beta$ -actina. Dados expressos como Média  $\pm$  erro padrão de controles (n= 7) e pacientes do grupo DH (n= 8). teste T não pareado com  $p < 0,05^{**}$  em relação ao grupo controle.



**Figura 15.** Expressão relativa de mRNA do gene DYNLT1, normalizada com o gene da  $\beta$ -actina. Dados expressos como Média  $\pm$  erro padrão de controles (n= 7) e pacientes do grupo DH (n= 9). teste T não pareado com  $p > 0,05$  em relação ao grupo controle.



**Figura 16.** Expressão relativa de mRNA do gene DCTN3, normalizada com o gene da  $\beta$ -actina. Dados expressos como Média  $\pm$  erro padrão de controles (n= 7) e pacientes do grupo DH (n= 9). Teste T não pareado com  $p > 0,05$  em relação ao grupo controle.

## 6 DISCUSSÃO

Primeiramente, é importante ressaltar que estudos relacionados à Doença de Huntington no Brasil e mais precisamente, no estado do Espírito Santo (ES), como propõe esta pesquisa, continuam sendo pouco realizados e encontrados na literatura. Além disso, questões éticas no que diz respeito ao teste preditivo em menores de 18 anos em conjunto com o conflito do diagnóstico em familiares de uma doença não curável, podem causar estigma, estresse psicológico e discriminação em potencial, o que dificulta a descoberta de mais casos e os avanços no conhecimento da doença.

Em muitos estudos no Brasil e no mundo, é possível observar que o número de casos analisados é pequeno, e por vezes até menor, se comparado ao presente trabalho, visto que este se restringe ao estado do ES. Em dois anos de estudo, foi possível encontrar indivíduos com sinais compatíveis com a doença em diversas cidades no Estado do Espírito Santo, totalizando 25 participantes, com média de 43

anos, sendo 60% do sexo feminino e 48% pertencentes à Grande Vitória. Estudos de Lima e Silva (2000), no sul e sudeste do Brasil, contaram com 44 participantes, 57% do sexo feminino, com média de 39 anos. Estudo de Azambuja, 2006, em São Paulo, obteve 26 participantes, 61,5% feminino, média de 48 anos. Em âmbito mundial, Toh e cols (2014), em Instituto de Pesquisa na Nova Zelândia, observou 22 doentes, 54,5% feminino, com média de 50 anos de idade, já Tabrizi e cols (2009) na Inglaterra, Canadá e França, analisou 123 doentes, 55% do sexo feminino, com média de 49 anos.

Com a clonagem do gene da DH em 1993 e a caracterização da mutação, um diagnóstico molecular preciso pode agora ser realizado, por meio do teste de reação em cadeia de polimerase (PCR) e sequenciamento molecular que identifica a presença da mutação e fornece o número exato de repetições da trinca CAG no alelo mutante, respectivamente. Em nosso estudo, a investigação gênica do alelo mutante foi feita por PCR (figuras 3 e 4) em pacientes com diagnóstico clínico e com história familiar positiva para DH, no entanto, a dificuldade com a amplificação por PCR do segmento específico de DNA neste trabalho, pode ser justificado pela região extremamente rica em GC próximo à expansão de CAG no gene IT15, o que faz com que seja difícil a hibridização dos iniciadores com o alvo em questão (ČULJKOVIĆA et al.,1997). Estudos mostraram que o tamanho da região CCG adjacente à região expandida de CAG, pode ser polimórfico em diferentes populações e está associado com sete repetições no cromossomo de pacientes afetados. Porém, não foi comprovado se estas repetições CCG teriam influência na apresentação clínica da DH (SEMAKA et al.,2006).

Os pacientes suspeitos da DH foram analisados por seqüenciamento gênico para quantificar o número de expansões de glutamina, confirmando a mutação em 68% (17) dos pacientes no grupo DH. Destes pacientes afetados, 88% apresentam a penetrância completa da doença com repetições acima de 40 CAG, ou seja, a doença é expressa clinicamente em todos os portadores do alelo expandido, sendo apenas 12% (alelos entre 36 e 39 repetições) dos doentes com apresentação incompleta do fenótipo correspondente, relacionados com um início mais tardio de doença. Com relação à etnia, ocorreu predominância um pouco mais africana (41%) do que europeu latino (35,2%), o que se mostra diferente de outros estudos com presença majoritária de etnia caucasóide (RASKIN, 2000; JANUÁRIO, 2011).

Nos doentes, o tamanho do alelo expandido situa-se entre 39 e 47 repetições CAG (média  $42,1 \pm 2,31$ ) e o alelo normal compreende entre 12 e 27 repetições CAG (média  $17,4 \pm 4,04$ ). Diferentemente do observado no total de participantes no início deste estudo, o grupo DH, formado por pacientes confirmados geneticamente, foi composto de 53% de homens e 47% de mulheres, o que não representa uma diferença considerável. No entanto, em outros estudos (AZAMBUJA, 2006; THOMPSON et al., 2012; LIMA E SILVA et al., 2000) existe uma predominância feminina na doença. Apesar disso, sabe-se que a doença tem igual probabilidade de afetar ambos os gêneros e que estes possuem a mesma chance de transmitir a característica para seus descendentes.

Também nos participantes deste estudo, verificamos que o tamanho da expansão CAG foi um pouco abaixo do encontrado no Sul e Sudeste do Brasil com média de 46 CAG (AZAMBUJA, 2006; RASKIN, et al., 2000; LIMA E SILVA et al., 2000) e mais próximo com estudos na Europa e América do Norte que apresentam um valor médio no comprimento da expansão CAG discretamente mais curto, com 41 repetições (PAULSEN et al., 2006; LANGBEHN et al., 2004). No grupo controle, observou-se variação nos dois alelos normais entre 13 e 28 repetições de CAG, assim verificamos a presença de um alelo intermediário de 28 CAG em um indivíduo deste grupo, o que representa 8,3% deste grupo. Considerando o grupo DH e o grupo controle, este alelo intermediário, também conhecido como alelo normal grande, representa 2,7% do total de participantes. Em estudo de Raskin (2000), com participantes brasileiros, foi observado 4% de alelos intermediários no grupo de origem caucasóide e 4,7% no grupo de origem africana, o que pode explicar a incidência de DH na população brasileira atual de origem africana neste estudo, visto que a instabilidade meiótica pode estar presente em alelo normais com 27 a 35 trincas CAG, podendo originar novos casos de doença na sua transmissão. Existem divergências quanto a real estimativa do risco de mutação do alelo intermediário, pois alguns autores defendem que a sua instabilidade é pequena, uma vez que apenas 0,06% mostraram ser instáveis na volumosa amostra referente às famílias venezuelanas (GAYÁN et al., 2008), já outro estudo reporta instabilidade em cerca de 30% dos casos na Colômbia (SEMAKA et al., 2009).

Diversos estudos têm, repetidamente, demonstrado existir uma relação inversa entre a idade de início dos sintomas da doença e o número de repetições da trinca CAG (JANUÁRIO, 2011; LANGBEHN et al., 2004; LIMA E SILVA et al., 2000;

BRINKMAN et al.,1997), sendo este o principal fator determinante da idade de início. Nos indivíduos deste estudo diagnosticados com DH, existe forte relação linear entre o número de repetições e a idade de aparecimento do primeiro sintoma ( $p < 0,05$ ,  $R^2=41,7\%$ ), com o número de repetições de trincas CAG correlacionando negativamente com a idade de início. Isto demonstra que o modelo de regressão é responsável por 41,7% da variância na idade de início sintomático, na nossa amostra. Em estudo feito por Andrew e colaboradores (1993), o mesmo modelo representou uma variação de 50% entre a idade de início sintomático e o número de repetições da trinca CAG. Para exemplificar este dado no estudo, a tabela 5 mostra um paciente que começou a apresentar sintomas da DH aos 29 anos, o mais precoce do grupo, e que possui o maior número de repetições, com 47 CAG. Os resultados que obtivemos, não confirmam qualquer influência do tamanho do alelo normal com o início dos primeiros sintomas ( $p=0,24$ ).

Reconhece-se como início da doença quando surgem sinais motores inequivocamente identificáveis, tais como os movimentos involuntários coreico-discinéticos. Na verdade, a alteração do movimento voluntário está presente precocemente na DH, mas a sua observação é difícil, mal avaliada e raramente reconhecida como manifestação inaugural. Só depois da progressão da doença, em análise retrospectiva, se valorizam sinais pré-existentes que não se reconheciam como patológicos. Da mesma forma, os sintomas comportamentais e cognitivos iniciais são dificilmente reconhecidos, sendo a sua identificação influenciada provavelmente pelo nível educacional do doente, pela informação que detém sobre a doença e pelo ambiente sócio-cultural onde está inserido (JANUÁRIO, 2011).

Sobre a forma de apresentação da doença, a forma juvenil, com início dos sintomas abaixo dos 20 anos, não foi observada. Neste estudo, todos os pacientes apresentam a forma tardia com sintomas iniciais entre 29 a 59 anos de idade (média de 41 anos), o que está de acordo com outros dados, em que na maioria dos pacientes, a doença se manifesta entre a terceira e quarta década de vida (HAYDEN, 1981). A idade atrasada de manifestação da doença, observada nestes pacientes, e já reconhecida na literatura, favorece a transmissão do gene para as próximas gerações, tornando difícil prevenir o aparecimento da doença na população. O desenvolvimento precoce dos sintomas (forma juvenil) está associado com a forma de transmissão genética de origem paterna, devido à maior instabilidade do número de repetições CAG durante a transmissão. Nos pacientes

deste estudo, a transmissão paterna foi predominante, com 58,8%, e a forma materna com 41,1%, no entanto, este dado não se relacionou com o aparecimento de nenhuma forma juvenil da doença. Neste sentido, ao analisar a relação do tamanho da expansão CAG do alelo mutante entre pacientes com transmissão paterna (média = 42,3 unidades CAG) e materna (média = 41,2 unidades CAG) mostrado na figura 7, não foi observada diferença estatística significativa (teste de Kruskal-Wallis:  $p=0,42$ ). Em estudo de Lima e Silva e colaboradores (2000) no Brasil, embora a transmissão paterna tenha sido maior em 32 doentes, também não houve diferença significativa no tamanho da repetição CAG expandida entre pacientes com transmissão paterna (média = 51,6 unidades CAG) e materna (média = 51,5 GAC).

Ao avaliar os sinais e sintomas clínicos dos pacientes, observa-se que estes apresentam tempo de doença médio de sete anos, portanto não são pacientes com a doença em sua fase inicial e, assim, apresentam sinais motores involuntários bem definidos. Em relato com familiares e os próprios pacientes, são frequentes episódios de desequilíbrio, queda, dificuldades de fala e disfagia. Já as manifestações comportamentais e psiquiátricas são múltiplas, compreendendo desde perturbações do humor, distúrbios de ansiedade, comportamentos obsessivos, compulsões, agressividade, irritabilidade e apatia. No entanto, ao contrário das manifestações motoras, estas são inconstantes no seu aparecimento, podendo ser evidente em alguns doentes ou estar completamente ausente em outros. Nos pacientes deste estudo, há queixas de ansiedade, impulsividade e agitação e com menor frequência para os sintomas de depressão, apatia e agressividade. Normalmente os pacientes não relataram tristeza, embora apresentem limitação das atividades diárias com a evolução da doença. A apatia foi observada em 5,8% do grupo DH, e é definida como perda de interesse, falta de motivação e redução do comportamento para novas atividades (MARIN,1995). É um sintoma psiquiátrico importante porque está presente em muitas doenças degenerativas como um marcador precoce da doença e está relacionada com a capacidade funcional (NEHL; PAULSEN, 2004). Os distúrbios cognitivos percebidos foram relacionados à falhas de memória e desatenção, com menor frequência para a confusão mental. A dificuldade da correta avaliação dos sintomas psiquiátricos e comportamentais limita ainda a sua valorização, apesar de ser vasta e muitas vezes preceder sintomas motores em muitos anos (FOLSTEIN et al.,1983).

A análise descritiva da média da pontuação do grupo DH na escala UHDRS mostra o nível de comprometimento dos pacientes nos aspectos motores, funcionais, psiquiátrico, comportamental e de independência. Os pacientes avaliados são diversificados quanto aos seus sintomas, que podem variar de acordo com a idade de início e a duração da doença. Neste estudo, observa-se pacientes com 3 até 10 anos de duração da doença, portanto na primeira consulta já se verifica uma pontuação motora total elevada com 58,8 pontos (0-124), avaliação comportamental pouco alterada com 25,05 pontos (0-176), avaliação funcional comprometida com 10,05 pontos (0-25), capacidade funcional total (TFC) baixa com 4,5 pontos (0-13) e pouca independência relacionada à atividade diária básica, doméstica e de administração de finanças com 57% (10-100%). Em levantamento feito por Januário (2011), em Portugal, a avaliação geral média da primeira consulta dos pacientes foi: componente motor total (31,9); avaliação comportamental (19,3); avaliação funcional (18,1); capacidade funcional total (TFC) (9,1) e independência (78,1%). Portanto, observa-se que nos pacientes deste estudo, houve maior alteração motora e funcional e pouca manifestação comportamental se comparado aos pacientes portugueses.

De acordo com *Shoulson e Fahn (1979)*, existem cinco índices de gravidade da doença. Os índices mais baixos indicam melhor integridade e preservação de funções. Aplicadas as escalas de funcionalidade à população doente, verifica-se que os 17 doentes se distribuem pelo estágio moderado (índice 3) e grave (índice 4 e 5). Não existiu nenhum paciente no estágio leve (índice 1 e 2), dessa forma, é justificável que as pontuações totais da avaliação motora e funcional sejam elevados e a função psiquiátrica e comportamental não esteja evidente, visto que estes são mais comuns no início da doença (TABRIZI et al.,2009). No que diz respeito ao tempo de duração da doença nos pacientes, não houve diferença significativa com a gravidade ( $p=0,27$ ), o que é esperado, já que dois indivíduos com o mesmo tempo de doença, mas com idades de início dos sintomas distintas, terão diferentes estágios de gravidade, isso porque, como citado anteriormente, a idade de início da DH está relacionado com a expansão de CAG, e isto influencia em como a doença vai progredir.

A capacidade funcional também tem sido o critério utilizado por muitos autores para distribuir os pacientes quanto à gravidade da doença, pois é um marcador precoce e mais sensível às alterações neuropsiquiátricas do que às perturbações

motoras ou cognitivas. A apatia, uma manifestação inicial que surge com um dano aos circuitos estriato-frontais, foi citada em estudos (THOMPSON et al., 2012), como sendo altamente relacionada com a capacidade funcional total (TFC), e esta, com a gravidade e progressão da doença. Como na literatura, a relação entre a TFC e a gravidade da doença, dividido em moderado e grave, neste estudo, foi estatisticamente significativa ( $p=0,006$ ), no entanto, a apatia não foi encontrada em muitos pacientes, apenas 5,8%. Em estudo de Tabrizi e cols (2009), a apatia foi mais observada em pacientes pré-sintomáticos do que diagnosticados, o que pode justificar a baixa frequência nesta amostra, já que todos são pacientes diagnosticados.

A deterioração motora é o sintoma mais clássico da DH. Os pacientes investigados neste estudo, apresentam alterações motoras em vários aspectos e estas são relacionadas de forma estatisticamente significativa com a gravidade da doença ( $p=0,005$ ) tornando-se mais evidente com sua evolução. Como citado anteriormente no grupo moderado, a dificuldade na realização de tarefas motoras finas (68,5%), seguido da alteração na função oculomotora (52,5%) foram as mais encontradas. Já no grupo grave, observou-se maior deterioração na função relacionada à marcha (96,6%) e na realização de tarefas motoras finas (96,5%). Segundo Gusella e MacDonald (2006), os sintomas motores começam sutilmente como movimentos espontâneos que evoluem para movimentos espasmódicos involuntários contínuos, dando lugar a eventual rigidez. No momento da primeira manifestação motora, estima-se que 20 a 30% dos neurônios do núcleo caudado já tenha sido comprometida. Estudo de Golding e cols (2006), também relata a presença de bradicinesia, rigidez, distonia e dificuldade na realização de tarefas motoras finas e na marcha associados à fase tardia da doença.

Além disso, distúrbios oculomotores ocorrem precocemente e tendem a piorar com a progressão da doença. A avaliação dos movimentos oculares, em particular os movimentos sacádicos, é alvo de intensa investigação, uma vez que envolve estudo dos circuitos fronto-estriatais e pode constituir um marcador precoce da doença (LEIGH et al., 1983) Dessa forma, os sintomas motores observados nos pacientes deste estudo, foram semelhantes ao encontrado por outros autores. É importante observar que, apesar da coréia ser um sintoma clássico e presente em todos os pacientes do estudo em algum segmento corpóreo no momento da avaliação, não é o movimento mais freqüente nos dois grupos mostrados. A coréia

interfere em todos os movimentos voluntários do doente, mas com a evolução do quadro, aparecem a distonia e a rigidez, esta, por sua vez, limita os movimentos coreiformes (HARPER,1996). Isso pode explicar a diminuição da coréia do grupo moderado (42,1%) para o grave (30,7%). Diferentemente da literatura e de outros trabalhos (SQUITIERI et al., 2000), não foi observado distonia nos pacientes deste estudo.

Sobre a influência dos aspectos clínicos e genéticos na independência dos pacientes, foi visto que existe relação estatística significativa da avaliação motora ( $p=0,004$ ) e do número de repetições de trinca CAG ( $p=0,02$ ) com a independência. A independência está relacionada com a autonomia do paciente em cuidados de higiene e alimentação, bem como na capacidade em realizar atividades domésticas, profissionais e financeiras, avaliando, portanto, a necessidade de cuidado básico ou especializado para tais tarefas. A média de independência dos pacientes avaliados foi de 57%, ou seja, a maioria já não é capaz de realizar atividades domésticas e profissionais e precisa de auxílio para higiene e alimentação. Como esperado, as alterações na função motora estão associadas com a independência do paciente. Estudo de Januário (2011) mostrou que o agravamento na função de marcha é o fator que mais influenciará o estado clínico e a independência do doente. Da mesma forma observa-se que a marcha foi a segunda alteração mais encontrada em pacientes graves deste estudo, e a que mais se alterou ao comparar pacientes em estágio moderado para grave. As características da marcha na DH são descritas como ausência de equilíbrio, balanceio bilateral, base alargada, perturbação nos movimentos associados dos membros superiores, atraso no início e velocidade inconstante do movimento (KOLLER; TRIMBLE, 1985). Com relação à repetição da trinca de CAG no alelo expandido de pacientes com DH, observou-se que o aumento desta repetição CAG, diminui a independência do paciente. Ravina e cols (2008) mostraram em seu trabalho que a adição de 10 unidades de CAG estaria associada ao aumento da progressão de 63% (7,7 pontos) sobre a pontuação total motora UHDRS, 71-170% sobre as medidas cognitivas UHDRS e 81% (9,2 pontos) na escala da independência, o que não foi visto na avaliação comportamental. Em nosso estudo não foi observada diferença estatística entre o alelo expandido CAG e a avaliação do componente motor ( $p=0,5$ ), da capacidade funcional ( $p=0,08$ ) e da avaliação comportamental ( $p=0,96$ ), no entanto, diversos estudos citados (JANUÁRIO, 2011; RAVINA et al., 2008) mostram que a relação entre o diagnóstico

molecular e o estudo clínico da escala UHDRS é fundamental para avaliação da taxa de progressão da doença nos pacientes.

Com o intuito de investigar os possíveis mecanismos fisiológicos que levam a diferentes manifestações clínicas, como as descritas neste estudo nos pacientes com a DH, diversos trabalhos tentam esclarecer o papel da htt mutante no processo de degeneração celular. Entre as diversas alterações celulares envolvidas na patologia da DH, destacam-se a disfunção mitocondrial precoce, supressão de fatores de transcrição, alteração na expressão gênica, diferentes associações protéicas que alteram o transporte celular, bem como alterações na sinalização celular envolvendo vários sistemas de neurotransmissores (ZABEL et al., 2009). Estudos mostram que estas alterações moleculares precedem o aparecimento dos sinais clínicos na DH (CHA et al., 1998; WEEKS et al., 1996), sendo assim, modelos de animais geneticamente modificados para DH têm sido propostos, com objetivo de compreender as alterações celulares patológicas observadas em humanos com a doença.

Entre estes, destaca-se um estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa (RIBEIRO et al., 2013) que avaliou o receptor metabotrópico de glutamato 5 (mGluR5), bastante expresso no corpo estriado e essencial tanto na modulação da atividade locomotora como na morte neuronal. Segundo alguns autores (RIBEIRO et al., 2010; ANBORGH et al., 2005), o bloqueio deste receptor promove alteração da atividade locomotora e aumento da sobrevivência de animais transgênicos para a DH. Sendo assim, estudo prévio (RIBEIRO et al., 2013) observou que modelos de animais que expressam a htt mutante e que são nocautes para o receptor mGluR5 ( $Hdh^{Q111/Q111}/mGluR5^{-/-}$ ), apresentaram atividade locomotora idêntica a dos animais controle ( $Hdh^{Q20/Q20}/mGluR5^{+/+}$ ), além disso, também apresentaram redução da formação de inclusões nucleares de htt mutante. Esses dados sugeriram a pesquisa de alterações na expressão gênica no estriado destes animais, como possível causa para estas adaptações à longo prazo provocadas pela htt mutante, que levam a alteração da conectividade e sinalização neuronal. Assim, foram detectados por ensaio de *microarray* vários genes alterados, entre estes o DNAH6, DYNTL1 e DCTN3, que foram selecionados para comparar se humanos portadores da DH apresentam essas mesmas alterações moleculares.

Portanto, o presente estudo de avaliação da expressão gênica relativa dos genes DNAH6, DYNTL1 e DCTN3 a partir do sangue coletado dos participantes é a

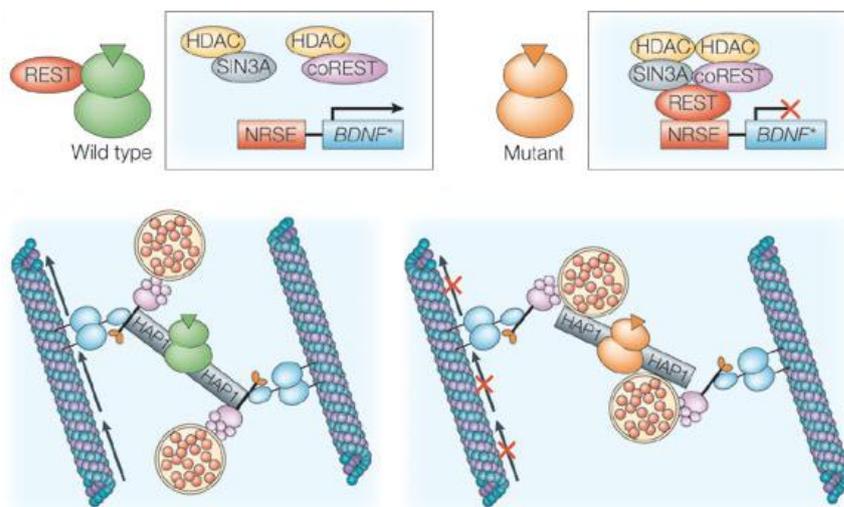
segunda parte complementar do estudo anterior citado em modelo animal de Ribeiro e colaboradores (2013). Estes genes expressam as proteínas dineína e dinactina, presentes em todas as células e responsáveis pelo transporte intracelular retrógrado. Sua alteração é de importante interesse, já que está relacionado à degeneração de neurônios motores (VALLEE et al., 2004). Nos pacientes com a DH, observou-se uma diminuição significativa da expressão do gene DNAH6 ( $p=0,0025$ ) em relação ao grupo controle. Este gene codifica a cadeia pesada axonal da dineína, responsável por aplicar a força mecânica para a superfície do microtúbulo (ASA; KOONCE, 2001). No estudo prévio (RIBEIRO et al., 2013), ocorreu uma hiperexpressão do gene DNAH6 (*upregulation*) seis vezes mais nos camundongos mutantes ( $Hdh^{Q111/Q111}/mGluR5^{-/-}$ ) em relação ao controle ( $Hdh^{Q20/Q20}/mGluR5^{-/-}$ ), o que está de acordo com o observado nos pacientes, visto que, por possuírem normalmente o receptor *mGluR5*, é esperado que a expressão do gene DNAH6 ocorra de forma contrária, sendo portanto, menos expresso em relação ao grupo de indivíduos controle.

Com relação à expressão do gene DYNLT1, que codifica a cadeia leve de dineína citoplasmática, não houve diferença significativa na expressão deste gene nos pacientes DH ( $p=0,08$ ), embora tenha sido observada uma tendência ao aumento de expressão em relação ao grupo controle. Este dado foi diferente do esperado em humanos, já que o estudo em animais mostrou um aumento de aproximadamente duas vezes na expressão do gene DYNLT1 em relação ao seu controle. Da mesma forma, a expressão do gene DCTN3 que codifica a cadeia leve de dinactina, não mostrou diferença ( $p=0,41$ ) para os grupos de pacientes com DH e grupo controle. Esta cadeia de dinactina é uma subunidade que auxilia a ligação da dineína aos microtúbulos, melhorando sua eficiência na motilidade celular (CHEVALIER-LARSEN; HOLZBAUR, 2006). Nos animais, ocorreu diminuição de quase duas vezes a expressão deste gene.

Embora o acúmulo intranuclear de htt mutante afete a expressão gênica em modelos animais e celulares de DH, a presença destes agregados de poliglutamina nos axônios é que estão relacionados com a neurodegeneração (LI et al., 2001). Estes agregados de htt mutante prejudicam a função axonal, a medida que formam um bloqueio físico e promovem interações bioquímicas alteradas com outras proteínas envolvidas na transcrição gênica, sinalização intracelular, tráfico vesicular, endocitose e metabolismo. Entre estas proteínas, destaca-se o complexo dineína e

dinactina, que, como citado, participa ativamente do transporte axonal celular (SZEKENYI et al., 2003). Recentes estudos em *Drosophila* e modelos celulares (CATTANEO et al., 2005; CHEVALIER-LARSEN; HOLZBAUR, 2006; ZALA et al., 2013) mostram que a proteína htt atua como reguladora positiva interagindo diretamente com a dineína e indiretamente com a dinactina, através da ligação da HAP1 com a subunidade p150<sup>Glued</sup> e participando tanto do transporte retrógrado como anterógrado (figura 17). Segundo Chevalier-Larsen e Holzbaur (2006), defeitos no complexo de dineína/dinactina, inibem o transporte axonal retrógrado que leva a falha na degradação de proteínas mal formadas da periferia da célula para o núcleo. Quando este processo de degradação natural falha, as proteínas defeituosas se acumulam nos axônios, prejudicando ainda mais o transporte celular que conduz a degeneração celular.

Assim, a htt mutante prejudica essa interação bioquímica, interrompendo a integridade do complexo dineína/ dinactina e inibindo o transporte celular. A dificuldade de interação da htt mutante com a dineína também prejudica o transporte vesicular de cargas, entre elas, o fator neurotrófico (BDNF), que medeia à sobrevivência dos neurônios do estriado (GAUTHIER et al., 2004).



Copyright © 2005 Nature Publishing Group  
 Nature Reviews | Neuroscience

Figura 17: Mecanismo de atuação da htt normal (*wild type*) e da htt mutante (*mutant*) com o complexo dineína/dinactina no controle do transporte de vesículas de BDNF.

Alguns estudos (CHEVALIER-LARSEN; HOLZBAUR, 2006; CAVISTON; HOLZBAUR, 2009) fortalecem a idéia de que uma mutação no complexo dineína/dinactina leva a acumulação de proteínas sinápticas e de vesículas nos axônios e isso se agrava com o aumento da idade. Além disso, o comprometimento da dineína também diminui a neurogênese, devido a sua importância na divisão celular, que provoca impacto na cognição dos pacientes com DH na fase adulta (ESCHBACH; DUPUIS, 2011). Uma importante evidência da interferência da mutação da dineína no fenótipo da DH está na alteração comportamental e motora observada de forma similar em modelos de animais em DH, associado a uma degeneração dos gânglios da base. De acordo com trabalho de Braunstein e cols (2010) em linhagens de camundongos portadores de mutações no gene da dineína de cadeia pesada (*DYNC1h1*), estes animais exibiram, numa fase precoce, aumento na atividade motora espontânea, falta de coordenação, hiperatividade, fraqueza muscular e alterações comportamentais, associados à redução do volume do corpo estriado. Outro estudo em modelo animal (ESCHBACH et al., 2010) reforça a ligação funcional entre a dineína e a htt, mostrando que a mutação na dineína no tecido adiposo esteve associada à diminuição dos níveis de htt neste tecido, além de diminuição da lipólise, um fenótipo semelhante na DH. Portanto, estes dados comprovam o envolvimento do transporte axonal e da atividade da dineína na manutenção da função do estriado que podem ter implicações importantes para a compreensão da DH e de outras doenças dos gânglios da base.

Frente aos resultados observados na avaliação da expressão gênica nos pacientes do grupo DH deste estudo, com alteração significativa da expressão do gene DNAH6, associado aos resultados anteriores do modelo animal de DH (RIBEIRO et al., 2013), sugerimos que o gene DNAH6 esteja relacionado com as alterações fenotípicas da doença, sendo possível marcador sanguíneo para auxílio no diagnóstico molecular para DH.

Para uma melhor compreensão dos aspectos moleculares que envolvem a interação da htt mutante com a alteração na expressão dos genes DNAH6, DYNTL1 e DCTN3 e, conseqüentemente, com as manifestações clínicas da doença, destaca-se a importância de mais estudos específicos sobre a expressão gênica em humanos com a DH, uma vez que existem poucas pesquisas que investigam as causas da disfunção da dineína e dinactina na DH.

Portanto, o conhecimento das características clínicas da doença, associado às alterações moleculares da htt mutante na expressão gênica de pacientes com DH, é de fundamental importância para a descoberta de novas rotas terapêuticas que possam contribuir para o tratamento e melhor qualidade de vida dos pacientes e seus familiares.

## 7 CONCLUSÃO

- O diagnóstico molecular para DH foi confirmado em 68% dos pacientes do grupo 2, com alelo expandido entre 39 e 47 repetições CAG e predominância africana.
- Existiu correlação negativa entre o número de repetições de CAG e a idade de aparecimento do primeiro sintoma nos pacientes com a DH, o que se mostrou de acordo com outros trabalhos afins.
- A transmissão genética foi predominante paterna, no entanto, este dado não se relacionou com nenhum aparecimento de forma juvenil da doença. Não foi observada diferença estatística ao analisar o tamanho da expansão CAG do alelo mutante entre pacientes com transmissão paterna e materna.
- A relação entre a capacidade funcional total (TFC) e a gravidade da doença nos pacientes com DH, foi estatisticamente significativa, demonstrando que pacientes em estágio grave apresentam maior dificuldade em realizar tarefas básicas.
- Os pacientes apresentam diferentes alterações motoras que dependem do estágio de gravidade que se encontram. Dessa forma, a relação entre o comprometimento motor e a gravidade da doença foi estatisticamente

significativa, mostrando que o agravamento dos movimentos involuntários reflete negativamente no prognóstico da DH.

- Também foi observado que o comprometimento da função motora e o aumento do número de repetições de trinca CAG se refletem negativamente na independência dos pacientes, sendo esta com média total de 57%.
- A relação entre o diagnóstico molecular e o estudo clínico da escala UHDRS é fundamental para avaliação da taxa de progressão da doença nos pacientes.
- Na avaliação da expressão gênica dos pacientes com DH, observou-se uma diminuição significativa da expressão do gene DNAH6 em relação ao grupo controle. Não foi visto diferença para os genes DYNTL1 e DCTN3.
- A diminuição da expressão do gene DNAH6 nos pacientes com DH, esteve de acordo com o esperado em estudo prévio nos camundongos com *htt* mutante e nocautes para receptor *mGluR5*, em que foi observado aumento na expressão do gene DNAH6 no estriado.
- Sugerimos a avaliação da expressão do gene DNAH6 como um possível marcador sanguíneo para complementar o diagnóstico molecular para DH.

## 8 REFERÊNCIAS

ADAM, O.R; JANKOVIC, J. Symptomatic treatment of Huntington disease. **Neurotherapeutics**, v. 5, n. 2, p. 181-197, 2008.

ANBORGH, P.H., et al. Inhibition of metabotropic glutamate receptor signaling by the huntingtin-binding protein optineurin. **J Biol Chem**. v. 280, p.34840-34848, 2005.

ANDREW, S.E., et al. The relationship between trinucleotide(CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. **Nat Genet**, v.4, p.398-403, 1993.

ARNULF, I.; NIELSEN J.; LOHMANN E.; et al. Rapid Eye Movement Sleep Disturbances in Huntington Disease. **Arch gen psychiatry**, v. 65, n. 4, p. 482–489, 2013.

ARRASATE, M; FINKBEINER, S. Protein aggregates in Huntington's disease. **Exp Neurol**, v. 238, p. 1-11, 2012.

ASAI, D.J; KOONCE,M.P. The dynein heavy chain : structure , mechanics and evolution.**Trends in Cell Biology**, v. 11, n. 5, p. 196-202 , 2001.

AZAMBUJA, Mariana Jardim. **Contribuição ao estudo da linguagem em indivíduos com doença de Huntington**. 2006. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Experimental) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

BORGONOVO, B; OUWENDIJK, J ; SOLIMENA, M. Biogenesis of secretory granules. **Curr Opin Cell Biol**, v. 18, p. 365-370, 2006.

BRAUNSTEIN, K. E., et al. A point mutation in the dynein heavy chain gene leads to striatal atrophy and compromises neurite outgrowth of striatal neurons. **Human Molecular Genetics**, v. 19, p.4385–4398, 2010.

BRINKMAN, R.R., et al. The likelihood of being affected with Huntington disease by a particular age, for a specific CAG size. **Am J Hum Genet**,v. 60, p.1202-1210, 1997.

CANNELLA, M., et al. The gender effect in juvenile Huntington disease patients of Italian origin. **Am. J. Med. Genet**, v. 125, p. 92–98, 2004.

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

CAVISTON, J.P., et al. Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. **Proc Natl Acad Sci**,v.104,p.10045-10050, 2007.

CAVISTON, J. P; HOLZBAUR, E. L. F. Huntingtin as an Essential Integrator of Intracellular Vesicular Trafficking. **Trends in Cell Biology**, v. 19, p.147–155, 2009.

CHA, J.H., et al. Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human Huntington disease gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p.6480–6485, 1998.

CHEVALIER-LARSEN, E; HOLZBAUR, E.L.F. Axonal transport and neurodegenerative disease. **Molecular Basis of Amyotrophic Lateral Sclerosis**, v.1762, p. 1094–1108, 2006.

COLINS, R.C. Doença de Huntington e ataxias hereditárias. 1 ed. Philadelphia: W.B Saunders Company, 1997.

CULJKOVIĆ, B., et al. Improved polymerase chain reaction conditions for quick diagnostics of Huntington disease. **Brain Res Brain Res Protoc**, v.2, p.44-46, 1997.

DIFIGLIA, M.; SAPP, E.; CHASE, K.; et al. Huntingtin Is a Cytoplasmic Protein Associated with Vesicles in Human and Rat Brain Neurons. **Neuron**, v. 14, p. 1075–1081, 1995.

DI MAIO, L.; SQUITIERI, F.; NAPOLITANO, G.; et al. Onset symptoms in 510 patients with Huntington ' s disease. **Journal of Medical Genetics**, v. 30, p. 289–292, 1993.

DRURY K.C., et al. Results on single cell PCR for Huntington's gene and WAVE product analysis for preimplantation genetic diagnosis. **Mol Cell Endocrinol**,v.183, p.1-4, 2001.

ESCHBACH, J; DUPUIS, L. Cytoplasmic dynein in neurodegeneration. **Pharmacology & Therapeutics**, v.130, p. 348–363, 2011.

ESCHBACH, J., et al. Mutations in cytoplasmic dynein lead to a Huntington's disease-like defect in energy metabolism of brown and white adipose tissues. **Biochim Biophys Acta**, v.1812, p.59-69, 2011.

FOLSTEIN, S., et al. The association of affective disorder with Huntington's disease in a case series and in families. **Psychol Med**,v.13, p.537-542, 1983.

FRANK, S. Tetrabenazine: the first approved drug for the treatment of chorea in US patients with Huntington disease. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 6, p. 657-665, 2010.

FRANK, S.; JANKOVIC, J. Advances in the pharmacological management of Huntington's disease. **Drugs**, v. 70, n. 5, p. 561-571, 2010.

GAUTHIER, L.R., et al. Huntingtin Controls Neurotrophic Support and Survival of Neurons by Enhancing BDNF Vesicular Transport along Microtubules. . **Cell Press**, v. 118, p. 127–138, 2004.

GAYÁN, J.,et al. Genomewide linkage scan reveals novel loci modifying age of onset of Huntington's disease in the Venezuelan HD kindreds. **Genet Epidemiol**,v. 32, p.445-453, 2008.

GERVAIS, F.G., et al. Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hipp1. **Nature Cell Biol**, v. 4, p. 95-105, 2002.

GOLDBERG, M.B.; KREMER, B.; ANDREW S.E.; et al. Molecular analysis of new mutations for Huntington's disease: intermediate alleles and sex of origin effects. **Nature genetics**, v. 5, p. 174 – 179, 1993.

GOLDING, C.V.,et al. Identification of an oculomotor biomarker of preclinical Huntington disease. **Neurology**, v.67, p.485-487, 2006.

GUSELLA, J.F.,et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. **Nature**, v.306, p.234-238, 1983.

GUSELLA, J.F; MACDONALD, M.E. Huntington's disease: seeing the pathogenic process through a genetic lens. **Trends Biochem Sci**, v.31, p.533-540, 2006.

HADDAD, M. S.; CUMMINGS, J.L. Huntington's disease. **Psychiatr Clin North Am**, v. 20, n. 4, p. 791-807, 1997.

HARPER, P.S. Huntington's Disease. London: W. B. Saunders, 1996.

HARPER, P.S. **Huntington's Disease**. London . W.B. Saunders, 1991.

HAYDEN, M.R. **Huntington's chorea**. Berlin: Springer-Verlag, 1981.

HERISHANU, Y. O.; PARVARI, R.; POLLACK, Y.; et al. Journal of the Neurological Sciences Huntington disease in subjects from an Israeli Karaite community carrying alleles of intermediate and expanded CAG repeats in the HTT gene : Huntington disease or phenocopy. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 277,n. 1-2, p. 143–146, 2009.

HO A.K.; SAHAKIAN B.J.; BROWN R.G.; et al. Profile of cognitive progression in early Huntington's disease. **Neurology**, v. 61, p.1702–1706, 2003.

HORGAN, C.P; MCCAFFREY, M.W. Rab GTPases and microtubule motors. **Biochem Soc Trans.** v.39, p.1202-1206, 2011.

HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded an unstable on huntington's disease chromosomes. **Cell**, v. 72, p. 971-983, 1993.

HUNTINGTON, G. On Chorea. **Neuropsychiatry classics**, v. 26, n. 15, p. 109–112, 2003.

INTERNACIONAL HUNTINGTON ASSOCIATION, WORLD FEDERATION OF NEUROLOGY. Guidelines for the molecular genetics predictive test in Huntington's disease. **J Med Genet.** v. 31, p. 555-559, 1994.

JANUÁRIO, C. *Doença de Huntington : onde estamos agora?* 2011. 129f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina - Universidade de Coimbra, Coimbra.

JORDE,L.B.; CAREY, J.C.; BAMSHAD, M. J.; WHITE, R.L. **Genética Médica.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

KARDON, J.R ; VALE, R.D. Regulators of the cytoplasmic dynein motor. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, p. 854-865, 2009.

KIRKWOOD S.C., et al. Confirmation of subtle motor changes among presymptomatic carriers of Huntington's disease gene. **Arch Neurol**, v. 57, p. 1040-1044, 2000.

KOLLER, W.C; TRIMBLE, J. The gait abnormality of Huntington's disease. **Neurology**, v.35, p.1450-1454, 1985.

KLEMPÍR, J. et al. Unified Huntington's disease rating scale: clinical practice and a critical approach. **Funct Neurol**, v.4, p. 217-221, 2006.

KREMER, B.; ALMQVIST, E.; THEILMANN, J., et al. Sex-Dependent Mechanisms For Expansions and Contractions of the CAG Repeat on Affected Huntington Disease Chromosomes. **American journal of human genetics**, v. 57, p. 343–350, 1995.

KREMER, B.; GOLDBERG, M.B.; ANDREW, S.E.; et al. A worldwide study of huntington's disease mutation. **The New England Journal of Medicine**, v. 330, p. 1401 – 1406, 1994.

KWINTER, D.M; SILVERMAN, M.A. Live imaging of dense-core vesicles in primary cultured hippocampal neurons. **J Vis Exp**, v. 27, 2009.

LANGBEHN, D.R., et al. A new model for prediction of the age of onset and penetrance for Huntington's disease based on CAG length. **Clin Genet**, v.66, p.267-277, 2004.

LANSKA, D.J. George Huntington (1850-1916) and Hereditary Chorea. **Journal of the History of the Neurosciences**, v. 9, n. 1, p. 76-89, 2000.

LEIGH, R.J., et al. Abnormal ocular motor control in Huntington's disease. **Neurology**, v. 33, p.1268-1275, 1983.

LI, H., et al. Huntingtin Aggregate-Associated Axonal Degeneration is an Early Pathological Event in Huntington's Disease Mice. **The Journal of Neuroscience**, v.21, p.8473-8481, 2001.

LI, S.; LI, X. Huntingtin – protein interactions and the pathogenesis of Huntington ' s disease. **Trends in genetics**, v. 20, n. 3, 2004.

LIM, D.; FEDRIZZI, L.; TARTARI, M.; et al. Calcium Homeostasis and Mitochondrial Dysfunction in Striatal Neurons of Huntington Disease . **The journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 5780 – 5789, 2008.

LIMA E SILVA, T. C., et al . Molecular diagnosis of Huntington disease in Brazilian patients. **Arq. Neuro-Psiquiatr**, v. 58, n. 1, p. 11-17, 2000 .

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

MARIN, R.S., et al. Apathy: a treatable syndrome. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v.7, p.23-30, 1995.

MARTIN, J.B.; GUSELLA, J.F. Huntington's disease: pathogenesis and management. **The New England Journal of Medicine**, v. 315, p. 1267-1276, 1986.

MELO, T.Q., et al. 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, 2013.

MENALLED, L.B. Knock-In Mouse Models of Huntington's Disease. **NeuroRx**, v. 2, p. 465-470, 2005.

MINK, J.W. The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. **Progress in Neurobiology**, v.50, p. 381-425, 1996.

MORO, E. et al. Bilateral globus pallidus stimulation for Huntington's disease. **Ann Neurol**, v. 56, n. 2, p. 290-294, 2004.

MORRISON, P.J. Estimates of prevalence of Huntington's disease in Caucasian populations are underestimated gross. **Mov. Disord**, v. 27, p. 1707 – 1708, 2012.

MYERS, R.H.; VONSATTEL, J.P.; STEVENS T.H., et al. Clinical and neuropathologic assessment of severity in Huntington's disease. **Annals of Neurology**, v. 9, p. 225:252, 1988.

NEHL, C; PAULSEN, J.S; HUNTINGTON STUDY GROUP. Cognitive and psychiatric aspects of Huntington disease contribute to functional capacity. **J Nerv Ment Dis**, v.192, p.72-74, 2004.

OKUN, M.S; THOMMI, N.; NEGRETTE, A. (1924 to 2003): diagnosing Huntington disease in Venezuela. **Neurology**, v. 63, n. 2, p. 340-343, 2004.

ONDO, W.G., et al. Tetrabenazine treatment for Huntington's disease-associated chorea. **Cli Neuropharmacol**, v. 26, n. 6, p. 300-302, 2002.

ORR, A.L. et al. N-terminais associados huntingtina mutantes com mitocôndrias e prejudica o tráfico mitocondrial. **J. Neurosci**, v. 28, p. 2783-2792, 2008.

OSLER, W. Historical note on hereditary chorea. **Neurographs**, v. 1, p. 113-116, 1908.

PAULSEN, J.S., et al. Preparing for Preventive Clinical Trials: The Predict-HD Study. **Arch Neurol**, v. 63, p. 883-890, 2006.

PARADISI, I; IKONOMU, V; ARIAS, S. Huntington disease-like 2 (HDL2) in Venezuela: frequency and ethnic origin. **Journal of Human Genetics**, v. 58, p. 3–6, 2013.

PASCHAL, B.M; SHPETNER, H.S; VALLEE, R.B. 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, 1987.

PRINGSHEIM T., et al. The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. **Mov Disord**, v. 27, p. 1083 – 1091, 2012.

QUARRELL, O. W. J.; RIGBY, A. S.; BARRON, L., et al. Reduced penetrance alleles for Huntington's disease: a multi-centre direct observational study. **Journal of Medical Genetics**, v. 44, p. 1–5, 2007.

RASKIN, S., et al. Huntington disease: DNA analysis in Brazilian population. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 58, p.977-985, 2000.

RAVINA, B., et al. The relationship between CAG repeat length and clinical progression in Huntington's disease. **Mov Disord**, v. 23, p.1223-1227, 2008.

RAYMOND, L.A., et al. Pathophysiology of Huntington's disease: time-dependent alterations in synaptic and receptor function. **Neuroscience**, v. 198, p. 252-273, 2011.

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

RIBEIRO, F.M., et al. Metabotropic glutamate receptor 5 knockout promotes motor and biochemical alterations in a mouse model of Huntington's disease. **Hum. Mol. Genet**, v. 23, p. 2030-2042, 2013.

SEMAKA, A.; COLLINS, J.A; HAYDEN, M.R. Unstable familial transmissions of Huntington disease alleles with 27–35 CAG repeats (intermediate alleles). **Am. J. Med. Genet.**, v. 153, p. 314–320, 2010.

SEMAKA, A.; CREIGHTON, S.; WARBY, S.; PREDICTIVE, H. Predictive testing for Huntington disease : interpretation and significance of intermediate alleles. **Clinical Genetic**, v. 70, p. 283–294, 2006.

SHARP, A. H.; LOEV, S. J.; SCHILLING, G.; et al. Widespread Expression of Huntington ' s Disease Gene ( IT15 ) Protein Product. **Neuron**, v. 14, p. 1065–1074, 1995.

SHOULSON, I; FAHN, S. Huntington disease: clinical care and evaluation. **Neurology**, v. 1, p. 1-3, 1979.

SNELL, R.G.,et al.Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. **Nat Genet**,v.4,p.393-397, 1993.

SQUITIERI F.,et al. Family and molecular data for a fine analysis of age at onset in Huntington disease. **Am J Med Genet**,v.95, p.366-373, 2000.

SQUITIERI, F., et al. Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course. **Brain**, v. 126, n. 4, p. 946-955, 2003.

SZEBENYI, G., et al. Neuropathogenic forms of huntingtin and androgen receptor inhibit fast axonal transport. **Neuron**, v.40, p.41-52, 2003.

TABRIZI, S.J., et al. “Biological and Clinical Manifestations of Huntington’s Disease in the Longitudinal TRACK-HD Study: Cross-Sectional Analysis of Baseline Data.” **Lancet neurology**, v.8, p. 791–801, 2009.

TELENIUS, H.; KREMER, H.P.; THEILMANN, J.; ANDREW, S.E.; et al. Molecular analysis of juvenile Huntington disease: the major influence on (CAG)<sub>n</sub> repeat length is the sex of the affected parent. **Hum. Mol. Genetic**, v. 2, p. 1535–1540, 1993.

THOMPSON, J.C., et al. Longitudinal evaluation of neuropsychiatric symptoms in Huntington's disease. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v.24,p.53-60, 2012.

TOH, E.A., et al. "Comparison of Cognitive and UHDRS Measures in Monitoring Disease Progression in Huntington's Disease: A 12-Month Longitudinal Study." **Translational Neurodegeneration**, v. 3, p.15, 2014.

VALLEE, R.B., et al. Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport. **J Neurobiol**, v. 58, p. 189-200, 2004.

VIDENOVIC, A. Treatment of Huntington Disease. **Curr Treat Options Neurol**, v. 15, n. 4, p. 424-438, 2013.

VONSATTEL, J.P.M.D., et al. Neuropathological classification of Huntington's Disease. **Journal of neuropathology and experimental Neurology**, v. 44, p. 559-577, 1985.

VONSATTEL, J.P.; DIFIGLIA, M. Huntington disease. **J. Neuropathol. Exp. Neurol**, v. 57, p. 369–384, 1998.

WALKER, F.O. **Doença de Huntington**. **Lancet**, v. 369, p. 218-228, 2007.

WARBY, S.C., et al. CAG expansion in the Huntington disease gene is associated with a specific and targetable predisposing haplogroup. **American Journal of Human Genetics**, v. 84, p. 351-366, 2009.

WARBY, S.C., et al. HTT haplotypes contribute to differences in Huntington disease prevalence between Europe and East Asia. **European Journal of Human Genetics**, v.19, p. 561-566, 2011.

WARNER, J.P; BARRON, L.H; BROCK, D.J. A new polymerase chain reaction(PCR) assay for the trinucleotide repeat that is unstable and expanded on Huntington's disease chromosomes. **Mol Cell Probes**,v.7, p.235-239, 1993.

WEEKS, R.A., et al. Striatal D1 and D2 dopamine receptor loss in asymptomatic mutation carriers of Huntington's disease. **Ann Neurol**, v.40, p.49-54, 1996.

WEXLER, N.S et al. A DNA polymorphism for Huntington's disease marks the future. **Arch Neurol**, v. 42, n. 1, p. 20-24, 1985.

WEXLER, A. Stigma, history, and Huntington's disease. **Lancet**, v. 376, p. 18-19, 2010.

WILLINGHAM D.B; KOROSHETZ, W.J. Evidence for dissociable motor skills in Huntington's disease patients. **Psychobiology**, v. 21, p. 173-82, 1993.

WHEELER, V.C., et al. Long glutamine tracts cause nuclear localization of a novel form of huntingtin in medium spiny striatal neurons in HdhQ92 and HdhQ111 knock-in mice. **Hum Mol Genet**, v. 9, p. 503-513, 2000.

ZABEL, C., et al. A Large Number of Protein Expression Changes Occur Early in Life and Precede Phenotype Onset in a Mouse Model for Huntington Disease. **Molecular & Cellular Proteomics : MCP**, v.8, p. 720–734, 2009.

ZALA, D; HINCKELMANN, M.V; SAUDOU, F. Huntingtin's Function in Axonal Transport Is Conserved in *Drosophila melanogaster*. **PLoS ONE**, v. 8, n.3, 2013.

ZOGHBI, H.Y. The expanding word of ataxins. **Nature genetics**, v. 14, p. 237– 238, 1996.

ZUCCATO, C; CATTANEO, E. O fator neurotrófico derivado do cérebro em doenças neurodegenerativas. **Nat. Rev. Neurol**, v. 5, p. 311-322, 2009.

## APÊNDICE 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Vitória-ES, 19 de agosto de 2011.

Do: Prof. Dr. Adauto Emmerich Oliveira  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde

Para: Prof. (a) Rita Gomes Wanderley Pires  
Pesquisador (a) Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: **“Investigação da função da huntingtina mutante sobre os sistemas neurotransmissores dos gânglios da base e identificação de drogas que normalizem tais alterações”**

Senhor (a) Pesquisador (a),

Informamos a Vossa Senhoria, que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Projeto de Pesquisa nº. **145/11** intitulado: **“Investigação da função da huntingtina mutante sobre os sistemas neurotransmissores dos gânglios da base e identificação de drogas que normalizem tais alterações”** e o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, **APROVOU** o referido projeto, em Reunião Ordinária realizada 10 de agosto de 2011.

Gostaríamos de lembrar que cabe ao pesquisador responsável elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra “c”.

Atenciosamente,

Coordenador do  
Comitê de Ética em Pesquisa  
CEP/UFES

Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde  
Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe – Vitória – ES – CEP 29.040-091.  
Telefax: (27) 3335 7504

## APÊNDICE 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
LABORATÓRIO DE NEUROBIOLOGIA MOLECULAR E COMPORTAMENTAL

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar de uma pesquisa, como voluntário. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, você não será prejudicado (a) de forma alguma. Em caso de dúvida, você pode procurar a pesquisadora responsável e/ ou as pesquisadoras participantes nos endereços referenciados abaixo ou o Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental no Departamento de Ciências Fisiológicas – UFES, seguinte endereço: Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória – ES.

### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

#### Título da pesquisa

Investigação da função da huntingtina mutante sobre os sistemas neurotransmissores dos gânglios da base e identificação de drogas que normalizem tais alterações.

#### Pesquisadora responsável

Prof.<sup>a</sup> Rita Gomes Wanderley Pires

e-mail: ritagwpires@gmail.com. Telefone: (27)3335-7559

#### Pesquisadores participantes

Maria do Carmo Souza Rodrigues

e-mail: rodriguesmcs@yahoo.com.br.

Vera Lucia Maia

e-mail: vera.maia@terra.com.br

#### Objetivos da pesquisa

Investigar como a proteína huntingtina mutante altera as funções de neurotransmissão glutamatérgica, dopaminérgica, colinérgica e GABAérgica no eixo nigro-estriatal, com o objetivo de buscar novas estratégias terapêuticas para tratar a sintomatologia motora da doença de Huntington (DH).

**Procedimentos da pesquisa**

A pesquisa tem como grupo-alvo os pacientes diagnosticados com DH no ambulatório de neurologia e genética médica do HUCAM-UFES. Todos participantes receberão orientação verbal e também através deste termo, o qual deverá ser assinado pelo participante ou por seu responsável, no caso de pacientes de menor idade, caso desejem participar da pesquisa. Após a manifestação livre de serem voluntários no estudo, os participantes terão seus prontuários consultados pela equipe de pesquisa para a coleta de dados necessária ao preenchimento da ficha clínica dos pacientes elaborada pelos pesquisadores do projeto. Os pacientes também passarão por anamnese e exame físico para coleta de dados complementares e coleta de amostra de sangue realizada pela médica Maria do Carmo Souza Rodrigues no local de atendimento dos pacientes (ambulatório ou domicílio). A amostra de sangue será colhida para os seguintes exames: identificação da huntingtina mutante, quantificação de glutamínicos na região amino-terminal da huntingtina, e análise da expressão gênica, para isso serão colhidos de 5 a 10 mL de sangue do participante com uso de material descartável.

**Riscos e desconfortos**

O procedimento nesta pesquisa que envolve situação de risco mínimo ocorre durante a coleta da amostra de sangue, na qual podem ocorrer manchas roxas (equimoses) e dor no local da coleta. Todos os outros procedimentos da pesquisa não acarretam nenhum tipo de risco para o paciente.

**Benefícios**

A participação nesta pesquisa possibilita ao participante que é assintomático e tem história genética de DH saber se vai desenvolver a doença, assim tratar os sintomas da doença precocemente. Aos participantes sintomáticos, diretamente, não terão benefício nenhum, pois o diagnóstico e tratamento para eles não sofrerão modificações, porém a realização dos exames num portador sintomático de DH permite a identificação da patogênese da doença e poderá contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos.

**Custo / Reembolso para o paciente**

Os pacientes não terão gastos adicionais por participarem da pesquisa e nem receberão qualquer espécie de reembolso ou gratificação devido a esta participação.

**Confidencialidade da pesquisa**

Garantimos sigilo que assegure a privacidade do participante quanto aos dados confidenciais, divulgando somente os dados diretamente relacionados aos objetivos da pesquisa.

**CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO**

Eu, \_\_\_\_\_, RG: \_\_\_\_\_,  
CPF: \_\_\_\_\_, aceito participar do estudo referido. Fui devidamente informado e esclarecido pelos pesquisadores sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer prejuízo.

Vitória, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2011

Assinatura

\_\_\_\_\_

## ANEXO 1

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

<u>AVALIAÇÃO MOTORA</u>	
<p><b>1-SEGUIMENTO OCULAR</b> 0- completo (normal) 1- movimento com abalos 2- seguimento com interrupções/amplitude completa 3- amplitude incompleta 4- incapaz de perseguir</p>	
<p><b>2-INÍCIO DO MOVIMENTO SACÁDICO</b> 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><b>3-VELOCIDADE DO MOVIMENTO SACÁDICO</b> 0- normal 1- leve alentecimento 2- moderado alentecimento 3- grave alentecimento, amplitude normal 4- amplitude incompleta</p>	
<p><b>4-DISARTRIA</b> 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><b>5-PROTUSÃO DA LÍNGUA</b> 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><b>6-BATIDA DOS DEDOS</b>                      <b>MSD</b>                      <b>MSE</b> 0- normal (≥ 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><b>7-PRONAÇÃO E SUPINAÇÃO DAS MÃOS</b> 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><b>MSD</b>                      <b>MSE</b></p>	
<p><b>8-LURIA</b> 0- ≥ 4/10 segundos, sem dica 1- &lt; 4/10 segundos, sem dica 2- ≥ 4/10 segundos, com dica 3- &lt; 4/10 segundos, com dica 4- não consegue executar</p>	
<p><b>9-RIGIDEZ</b>                      <b>MSD</b>                      <b>MSE</b> 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><b>10-BRADICINESIA CORPORAL</b> 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><b>11-DISTONIA TRONCO</b>                      <b>MSD</b>                      <b>MSE</b>                      <b>MID</b>                      <b>MIE</b> 0- normal 1- leve/intermitente 2- leve/constante ou moderada/intermitente 3- moderada/comum 4- acentuada/prolongada</p>	
<p><b>12-CORÉIA FACE BOL TRONCO</b>                      <b>MSD</b>                      <b>MSE</b>                      <b>MID</b>                      <b>MIE</b> 0- normal 1- leve/intermitente 2- leve/constante ou moderada/intermitente 3- moderada/comum 4- acentuada/prolongada</p>	
<p><b>13-MARCHA</b> 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><b>14-MARCHA PÉ-ANTE-PÉ</b> 0- normal por 10 passos 1- 1 a 3 desvios da linha 2- &gt; 3 desvios 3- não consegue nem completar o percurso 4- não consegue nem iniciar</p>	
<p><b>15-ESTABILIDADE POSTURAL</b> 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>	
<b><u>GRAVIDADE (G):</u></b> 0= ausente 1= leve, questionável 2= leve 3= moderada 4= acentuada	<b><u>FREQUÊNCIA (F):</u></b> 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/coleccionar 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>
<input type="checkbox"/> paciente pode se engajar em um serviço remunerado na sua atividade profissional habitual? <input type="checkbox"/> paciente pode se engajar em qualquer tipo de serviço remunerado? <input type="checkbox"/> paciente pode se engajar em qualquer tipo de serviço não-remunerado ou voluntário? <input type="checkbox"/> paciente pode cuidar de seu movimento financeiro mensal sem ajuda? <input type="checkbox"/> paciente pode comprar mantimentos sem ajuda? <input type="checkbox"/> paciente pode lidar com troco no caso de uma compra? <input type="checkbox"/> paciente pode cuidar de crianças sem auxílio? <input type="checkbox"/> paciente pode dirigir um automóvel sozinho e com segurança? <input type="checkbox"/> paciente pode fazer seus serviços de casa sem ajuda? <input type="checkbox"/> paciente pode cuidar de suas roupas (lavar/secar/passar) sem ajuda? <input type="checkbox"/> paciente pode preparar suas refeições sem ajuda? <input type="checkbox"/> paciente pode usar o telefone sem ajuda? <input type="checkbox"/> paciente pode tomar suas medicações sem ajuda? <input type="checkbox"/> paciente pode se alimentar sozinho sem ajuda? <input type="checkbox"/> paciente pode se vestir sem ajuda? <input type="checkbox"/> paciente pode tomar banho sem ajuda? <input type="checkbox"/> paciente pode usar transporte público sem ajuda? <input type="checkbox"/> paciente pode ir sozinho a pé a lugares próximos de casa sem ajuda? <input type="checkbox"/> paciente anda sem cair? <input type="checkbox"/> paciente anda sem ajuda? <input type="checkbox"/> paciente se penteia sem ajuda? <input type="checkbox"/> paciente pode trocar de cadeira sem ajuda? <input type="checkbox"/> paciente pode deitar e levantar da cama sem ajuda? <input type="checkbox"/> paciente usa o banheiro sem ajuda? <input type="checkbox"/> paciente pode ser cuidado em casa?

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

<b>ESCALA DE INDEPENDÊNCIA</b>
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

