

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Doença de Huntington: um estudo de coorte sobre aspectos genéticos e potenciais biomarcadores

Autor: Raphael Machado de Castilhos

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular)

Orientadora: Prof^ª Laura Bannach Jardim

Co-orientadora: Prof^ª Maria Luiza Saraiva-Pereira

Porto Alegre

Maio de 2017

Instituições e Fontes Financiadoras

As avaliações clínicas foram realizadas no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e nos ambulatórios de neurogenética do Hospital São Paulo (Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP) e do Hospital Graffrée e Guinle (Universidade Federal do Rio de Janeiro - UNIRIO).

As análises moleculares e bioquímicas foram realizadas respectivamente nos Laboratórios de Identificação Genética, Centro de Pesquisa Experimental, e de Análise de Metabólitos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Parte dos dados utilizados no presente estudo foram provenientes da Rede Neurogenética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Este estudo recebeu apoio financeiro do Edital Pesquisa Para o SUS, subsidiado pelo Ministério da Saúde e pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio Grande do Sul (PPSUS FAPERGS), através do Processo número 1209-2551/13-4 e do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), através dos processos número 13-0182, 13-0183 e 14-0348.

O aluno recebeu apoio financeiro a uma das missões de campo do Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INAGEMP).

It is spoken of by those in whose veins the seeds of the disease are known to exist, with a kind of horror, and not at all alluded to except through dire necessity, when it is mentioned as "*that disorder*."

George Huntington, 1872

Dedicatória

Para minha filha Isabela e minha esposa Fabiane

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof^ª. Laura Bannach Jardim, por ser uma pesquisadora brilhante e desde o início de minha formação como pesquisador, inculcar em mim ensinamentos fundamentais para a vida toda, como disciplina, pensamento crítico e dedicação à pesquisa.

À minha co-orientadora, Prof^ª. Maria Luiza Saraiva-Pereira pela ajuda com os dados laboratoriais e interpretação dos resultados.

Aos bolsistas de iniciação científica José Augusto dos Santos e Marina Coutinho Augustin pela ajuda fundamental na aplicação das escalas clínicas.

À equipe do Laboratório de Identificação Genética, especialmente Gabriel Vasata Furtado, Márcia Polese-Bonatto e Luiza Paulsen Rodrigues, pelas análises moleculares.

À Prof^ª. Carmen Regla Vargas e à Ângela Sitta, do Laboratório de Análise de Metabólitos (LAM), pela realização das análises bioquímicas e interpretação dos resultados.

Aos colegas da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), em especial aos Professores José Luiz Pedroso, Orlando Barsottini, Patrícia Saba e Henrique Ballalai pelo suporte na coleta de dados no ambulatório de Neurogenética e Neurologia no Hospital São Paulo.

Aos colegas da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), em especial o Prof. Fernando Regla Vargas, pelo suporte na coleta de dados no ambulatório de Neurogenética do Hospital Gaffrée e Guinle.

À Isabel Alonso e ao Prof. Jorge Sequeiros, do Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, Portugal, pelas análises moleculares dos pacientes com suspeita de HDL-2.

À Prof^a Vanessa Bielefeldt Leotti, pela ajuda com as análises estatísticas.

Ao colega Lucas Sena pela ajuda com a elaboração dos heredogramas.

Aos colegas do serviço de neurologia do Hospital Nossa Senhora da Conceição, pelo convívio amistoso e compreensão pelas ausências.

Aos Professores e colegas do serviço de neurologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por me apoiarem nos momentos finais da elaboração da tese.

Ao Prof. Luiz Nelson Teixeira Fernandes, pelo seu respeito à semiologia neurológica e por ter transmitido esse respeito a seus alunos.

Ao Prof. James Gusella, do *Massachusetts General Hospital*, Boston, pela análise dos haplogrupos.

A Mario Cornejo e Pilar Mazzetti, do Instituto de Nacional de Ciencias Neurológicas, Lima, Peru, por compartilharem seus resultados sobre as origens ancestrais da doença de Huntington no Peru.

À Claudia Perandones, do Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, pelo auxílio na revisão sistemática e pelos contatos feitos com o Enroll-HD.

À Rede Neurogenética. Através dessa Rede de diagnósticos, foi-me possível estabelecer as colaborações com pesquisadores brasileiros e latino-americanos, em especial os de São Paulo, Rio de Janeiro, Peru e Argentina. A estrutura da Rede foi o fator crucial para o diagnóstico e reunião de uma coorte substancial de brasileiros portadores da condição tão rara que escolhi estudar.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA), pelo apoio financeiro ao projeto.

Ao Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INAGEMP) pela bolsa de apoio tecnológico recebida e também pelo apoio financeiro para uma das missões de trabalho no Rio de Janeiro. Agradeço também pelo financiamento de um workshop apresentado por Belén Comas, do Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas “Norberto Quirno” (CEMIC), La Plata, Argentina, sobre o uso do programa Progeny.

À Belén Comas, do *Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas “Norberto Quirno” (CEMIC)*, La Plata, Argentina, pela orientação no uso do programa Progeny, por sua disponibilidade e paciência em nos ensinar.

À Red Iberoamericana multidisciplinar para el estudio de los trastornos del movimiento (RIBERMOV) agradeço pela bolsa para viagem de estudos para Lima, Peru e pela oportunidade de vir a conhecer pesquisadores latino-americanos que depois participaram das investigações apresentadas na minha tese, como Mario Cornejo e Pilar Mazzetti, do Peru, e Claudia Perandones, da Argentina.

Às Prof^{as}. Patrícia Ashton Prolla e Ida Vanessa Doederlein Schwartz pela ajuda na disciplina de prática de ensino.

À minha filha Isabela e minha esposa Fabiane, pelo imenso amor que dedicam a mim todos os dias. A realização desta tese não seria possível sem elas.

A meus pais, José Luiz e Rosângela e meus irmãos Gabriela e Guilherme, por todo o apoio que têm me dado ao longo da vida.

Às famílias com doença de Huntington, pela colaboração com a pesquisa e por não perderem a esperança.

Sumário

Lista de abreviaturas e unidades	10
Lista de tabelas	11
Resumo	12
Capítulo 1: Introdução	18
1.1 Doença de Huntington – perspectiva histórica	19
1.2 Epidemiologia.....	20
1.3 Manifestações clínicas	22
1.4 Diagnóstico diferencial	24
1.5 Escalas clínicas na doença de Huntington.....	26
1.6 História natural da doença de Huntington	27
1.7 Biomarcadores na doença de Huntington	29
1.8 Alterações no metabolismo energético na doença de Huntington.	30
1.9 Carnitina e aminoácidos cadeia ramificada (AACR) na doença de Huntington	31
1.10 Aspectos genéticos	37
Capítulo 2. Justificativas, hipóteses e objetivos	40
Capítulo 3. Genetic aspects of Huntington’s disease in Latin America. A Systematic Review	43
Capítulo 4. Huntington disease and Huntington disease-like in a case series from Brazil	44
Capítulo 6. Carnitine and branched chain amino acids were not good biomarkers for disease progression in Huntington’s disease.....	64
Capítulo 7. Discussão.....	88
Bibliografia.....	95
Apêndices	103
Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	104
TCLE para os indivíduos em risco de desenvolver HD	104
TCLE para os indivíduos HD sintomáticos	108
TCLE para o projeto biomarcadores (indivíduos HD sintomáticos)	111
TCLE para o projeto biomarcadores (indivíduos em risco de desenvolver HD).....	114
Anexos	117

Lista de abreviaturas e unidades

AACRs: aminoácidos de cadeia ramificada

ATP: adenosina trifosfato

ATXN2: gene causador da SCA2

CAG: glutamina

CAGexp: segmento expandido CAG

CAP: CAG age product

DRPLA: atrofia dentato-rubro-palido-luisiana

GEE: *Generalized Estimating Equation*

HD: Huntington's disease

HDL: *Huntington's disease-like*

HN: História natural

HTT: gene causador da HD

IMC: índice de massa corporal

μmol/L: micromoles por litro

PoliQ: poliglutamina

PRNP: gene causador da HDL-1

PST: *presymptomatic test*

SCA: ataxia espinocerebelar

TBP: TATA box-binding protein

TFC: *Total Functional Capacity*

UHDRS: *Unified Huntington's Disease Rating Scale*

UNIFESP: Universidade Federal do Estado de São Paulo

UNIRIO: Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

VPS13A: gene causador da coreia-acantocitose

Lista de tabelas

Tabela 1. Estrutura resumida da UHDRS

Tabela 2. Estudos que avaliaram os AACRs e carnitinas em indivíduos portadores da expansão CAG no gene *HTT*

Tabela 3. Tipos de alelos possíveis no gene *HTT* e sua relação com a doença de Huntington.

Resumo

Introdução: A doença de Huntington é uma doença neurodegenerativa autossômica dominante causada pela expansão de um segmento repetitivo CAG no gene *HTT*. Caracteriza-se por transtornos do movimento, em especial coreia, alterações comportamentais e declínio cognitivo. A doença tem um curso progressivo e inexorável.

Objetivos: Este estudo tem os seguintes objetivos: (1) revisar de forma sistemática os estudos sobre doença de Huntington na América Latina; (2) determinar a proporção de casos brasileiros com fenótipo doença de Huntington que são portadores da expansão no gene *HTT*; (3) caracterizar as transmissões CAGexp na coorte *HTT* e determinar se idade do genitor está associado à piora das instabilidades; (4) descrever a progressão das manifestações neurológicas, IMC e concentrações séricas de carnitina livre, valina, leucina e isoleucina durante o período de seguimento; (5) definir se as progressões desses candidatos a biomarcadores acompanham a piora neurológica e podem superar a sensibilidade da escala UHDRS na descrição da progressão da doença.

Métodos: Realizamos uma revisão sistemática dos aspectos genéticos da doença de Huntington na América Latina. Em seguida recrutamos pacientes com o fenótipo doença de Huntington de vários centros do país através da Rede Neurogenética e avaliamos a proporção de diagnósticos confirmados. Nas famílias provenientes de nosso centro e dos hospitais São Paulo (UNIFESP) e Gaffrée e Guinle (UNIRIO), recrutamos indivíduos sintomáticos e em risco para caracterizar as transmissões CAGexp e avaliar fatores que determinam as instabilidades. Nos mesmos centros que avaliamos as transmissões, selecionamos um grupo de indivíduos sintomáticos e em risco para determinar as concentrações séricas de carnitina livre, valina, leucina e isoleucina e as correlacionar com variáveis de gravidade da doença (IMC, escala UHDRS). O

comportamento desses potenciais biomarcadores foi avaliado de forma prospectiva em um grupo de indivíduos sintomáticos.

Resultados: Constatamos a escassez de estudos sobre aspectos moleculares da doença de Huntington na América Latina e Brasil. Das 104 famílias com fenótipo doença de Huntington recrutadas em diversos centros do Brasil, 93 (89,4%) apresentavam expansão CAG no gene *HTT*; 4 (3,8%) apresentam o diagnóstico de HDL-2 (Huntington's disease-like 2); 1 (1%) apresentam expansão CAG no gene *ATXN2* (*SCA2*); e 6 (5,8%) ficaram sem diagnóstico. Um número substancial de portadores foi recrutado e permitiu estimar a prevalência mínima da doença, ao menos no Rio Grande do Sul. Além disso, trinta e duas transmissões de genitor para filho (13 paternas e 19 maternas) foram obtidas nessa coorte. As transmissões paternas foram mais instáveis do que as maternas ($p=0.005$, Mann-Whitney). As transmissões paternas foram mais frequentemente expansões (69,2% expansões) e as maternas foram mais estáveis (57,9% estáveis) ($p=0,004$, Fisher). Em 51 pares de irmãos incluídos, a idade do progenitor no momento da concepção não pareceu estar relacionada com aumento da instabilidade do CAGexp.

Na avaliação dos potenciais biomarcadores, incluímos 116 indivíduos (74 sintomáticos, 20 portadores assintomáticos e 22 não portadores). No baseline, os níveis (mediana/intervalo interquartil) de valina estavam reduzidos tanto em indivíduos sintomáticos (110 / 88,4-131) como nos portadores assintomáticos (101,25 / 79,6-123,5) em comparação com não portadores (123 / 98.65– 164.25) ($p=0.018$ e $p=0.042$, Mann-Whitney). Não houve diferença entre os grupos nos níveis de carnitina e isoleucina+leucina (ns, Kruskal-Wallis). Na avaliação de seguimento em 43 indivíduos sintomáticos (mediana=1,08 anos), o escore motor total da UHDRS aumentou 4,8 pontos ($p = 0.001$, GEE) e a escala funcional TFC reduziu 0,89 pontos ($p < 0.0001$, GEE). O IMC ($p=0,52$, GEE) e os níveis de valina ($p=0,43$, GEE) permaneceram estáveis e os níveis de carnitina ($p=0,039$, GEE) e isoleucina+leucina ($p=0,037$, GEE) aumentam durante o seguimento.

Conclusão: Os resultados desses estudos conseguiram traçar um perfil mais acurado da doença de Huntington no Brasil, tanto do ponto de vista epidemiológico quanto no comportamento das transmissões CAG nas famílias identificadas. A progressão da doença, medida pela UHDRS, foi semelhante à observada em coortes do Hemisfério Norte. Além disso, verificamos que a carnitina livre e os aminoácidos de cadeia ramificada não são bons biomarcadores de progressão na doença de Huntington.

Abstract

Introduction: Huntington's disease is an autosomal dominant neurodegenerative disease caused by an expansion of a repetitive CAG segment in the *HTT* gene. Movement disorders (especially chorea), behavioral problems and cognitive decline characterize the disease, which has an inexorable progression. Up to now, there is no disease modifying treatment for Huntington's disease.

Objectives: This study aimed to address the following objectives: (1) review, in a systematic manner, studies of Huntington's disease in Latin America; (2) determine the proportion of cases with Huntington's disease phenotype that are carriers of the expansion in the *HTT* gene; (3) characterize CAGexp transmissions in the *HTT* cohort and determine a possible association of the age of the parent with further instability of CAGexp; (4) describe the progression of neurological manifestations, BMI and serum concentrations of free carnitine, valine, leucine and isoleucine during a follow-up period; (5) determine whether changes in time of these compounds are correlated with the simultaneous neurological worsening and if they may overcome the sensitivity of the UHDRS scale in describing the progression of the disease.

Methods: We performed a systematic review of the genetic aspects of Huntington's disease in Latin America. We then recruit patients with the Huntington's disease phenotype from various centers throughout the country through the Rede Neurogenética and evaluate the proportion of confirmed diagnoses. In families from our center and hospitals São Paulo (UNIFESP) and Gaffrée and Guinle (UNIRIO), we recruit symptomatic and at-risk individuals to characterize CAGexp transmissions and evaluate factors that determine instabilities. In the same centers that evaluated the transmissions, we selected a group of symptomatic and at-risk individuals to determine serum free carnitine, valine, leucine, and isoleucine levels and to correlate them with disease severity variables (BMI, UHDRS scale). The behavior of these potential biomarkers was evaluated prospectively in a group of symptomatic individuals.

Results: We found a lack of studies on genetic aspects of Huntington's disease in Latin America and Brazil. Ninety-three (89.4%) out of 104 families with Huntington's disease phenotype recruited in several centers in Brazil had CAG expansion in the *HTT* gene; 4 (3.8%) had the diagnosis of HDL-2 (Huntington's disease-like 2); 1 (1%) a CAG expansion in the *ATXN2* gene (*SCA2*); and 6 (5.8%) remained undiagnosed. Two hundred and seventy-nine carriers were included in our cohort, allowing to estimate the minimal prevalence of disease in Rio Grande do Sul as 1.85/100,000. Thirty-two transmissions (13 paternal and 19 maternal) were obtained. Parental transmission was more unstable than maternal transmission ($p = 0.005$, Mann-Whitney). Parental transmission most often expanded (69.2%), and maternal was more often stable (57.9% stable) ($p = 0.004$, Fisher). In 51 pairs of siblings included, age of the progenitor at conception did not appear to be related to increased instability of CAGexp. A total of 116 individuals (74 symptomatic, 20 asymptomatic carriers and 22 non-carriers) were included in the biomarkers analysis. At *baseline*, valine (median / interquartile range) levels were reduced in both symptomatic (110 / 88.4-131) and asymptomatic carriers (101.25 / 79.6-123.5) when compared to non-carriers (123 / 98.65- 164.25) ($p = 0.018$, $p = 0.042$, Mann-Whitney). There was no difference between groups in their levels of carnitine and isoleucine + leucine (ns, Kruskal-Wallis). In the follow-up evaluation in 43 symptomatic individuals (median = 1.08 years), the total motor score of the UHDRS increased by 4.8 points ($p = 0.001$, GEE) and the functional TFC scale decreased 0.89 points ($p < 0.0001$, GEE). BMI ($p = 0.52$, GEE) and valine levels ($p = 0.43$, GEE) remained stable and levels of carnitine ($p = 0.039$, GEE) and isoleucine + leucine ($p = 0.037$, GEE) increased during follow-up.

Conclusion: The results of these studies drew a more accurate profile of Huntington's disease in Brazil, since they generated both a minimal prevalence in our region and the behavior of CAG transmissions in the Brazilian families. Disease progression as measured by UHDRS was similar to the progression rate observed in cohorts from the North Hemisphere. In addition, we have found that

free carnitine and branched-chain amino acids are not suitable to be considered good biomarkers of HD progression.

Capítulo 1: Introdução

1.1 Doença de Huntington – perspectiva histórica

A primeira descrição detalhada das características clínicas e hereditárias da enfermidade que depois levaria seu nome deve-se ao médico George Huntington. Em 15 de fevereiro de 1872, apresenta, diante da Academia de Medicina de Middleport, Ohio, um relato de uma série de famílias cujos indivíduos apresentavam uma doença caracterizada por coreia e demência progressivas e com componente familiar muito marcado (Huntington, 1872). Ao longo do século XIX e XX, a coreia de Huntington (como era então conhecida a doença de Huntington) foi objeto de estudo de diversos neurologistas, mas foi somente na década de 70 do século passado que as investigações sobre a causa genética da doença se iniciaram de forma objetiva e a América Latina (AL) teve papel fundamental nessa descoberta. Em meados dos anos 50, o médico venezuelano Americo Negrette notou uma quantidade incomum de indivíduos com sintomas sugestivos de coreia de Huntington e que viviam em comunidades isoladas ao redor do Lago Maracaibo, Venezuela (Okun, et al., 2004). Essa concentração incomum de casos levou, após o relato de um estudante de Negrette em simpósio realizado em Ohio em 1972 (Ávila-Girón, 1973), a visitas regulares de investigadores norte-americanos àquelas comunidades, patrocinadas pela Hereditary Disease Foundation e lideradas pela pesquisadora Nancy Wexler. Apesar de o objetivo inicial desse grupo de investigadores ter sido a descoberta de possíveis homozigotos, o estudo maciço de centenas de indivíduos sintomáticos e em risco para doença de Huntington (Huntington's disease - HD), no Maracaibo, levou à descoberta do locus em 1983 (Gusella, et al., 1983) e do gene em 1993 (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Em consequência, hoje sabemos que a HD é devida à expansão dominante de uma sequência repetitiva de tripletos CAG (CAGexp) na matriz de leitura do *HTT*, localizado no braço curto do cromossomo 4 (4p16.3), sendo esse o único gene associado à HD (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993).

Desde a descoberta do locus, em 1983, a HD tem sido uma das doenças genéticas mais estudadas do mundo. Aportes financeiros privados elevados subsidiaram a formação de consórcios internacionais (COHORT, REGISTRY, ENROLL-HD), com registros de milhares de sujeitos provenientes de países europeus, Estados Unidos, Canadá e Austrália (Huntington Study Group, et al., 2012;Orth, et al., 2010;Enroll-HD). Esses grandes registros permitiram descrições quantitativas da história natural (HN) da HD, cujos detalhes serão revistos em seguida. Também aceleraram a realização de ensaios clínicos complexos, ainda que não de todo eficazes até o momento.

Embora o aporte de conhecimentos sobre a HD tenha sido extraordinário, os estudos genéticos e clínicos realizados pelos consórcios mencionados focalizaram-se nas populações do hemisfério norte. Em contraste, o conhecimento sobre a HD na AL e no Brasil é muito rudimentar. A HD é subnotificada, há poucos relatos de caso e quase nada se sabe sobre suas características genéticas e peculiaridades clínicas na AL e no Brasil.

1.2 Epidemiologia

A HD foi descrita em várias regiões do mundo e em todos os continentes, mas sua frequência é maior em populações com descendência europeia. Em países com predomínio de população de descendência europeia, a prevalência varia entre 5-10/100.000 (Rawlins, et al., 2016). Em regiões geográficas onde a população majoritária não tem descendência europeia, a prevalência é menor; em países africanos com predomínio de população negra, a prevalência descrita varia entre 0,1-1/100.000 (Hayden, et al., 1980;Scrimgeour, et al., 1992). Em países asiáticos, a prevalência da HD é ainda menor, 0,11-0,72/100.000 (Adachi, et al., 1999;Chen, et al., 2010). A menor prevalência de HD em populações africanas negras pode eventualmente estar associada a falhas no recrutamento dos casos. Em países asiático, como Japão e Taiwan, onde o acesso aos serviços de saúdes

é amplo, a prevalência mais baixa provavelmente seja real (Rawlins, et al., 2016). Buscam-se razões para essas diferenças. A hipótese de um efeito fundador muito antigo em europeus é de difícil sustentação, hoje em dia, já que não há evidência de um alótipo único, ancestral. Existem haplogrupos (ou reuniões de haplótipos semelhantes, mas sem uma sucessão unívoca temporal) com frequências distintas entre europeus e asiáticos. Essa diferença levou à hipótese de que o haplogrupo A, mais encontrado em europeus, predisporia, por razões ainda desconhecidas, a maiores instabilidades da sequência CAG e, portanto, a taxas de mutação maiores do que os demais haplogrupos. Isso poderia ser uma das explicações para a diferença de prevalências entre europeus e asiáticos (Warby, et al., 2011). Um dado muito interessante e que pode ora ser visto como evidência em favor da hipótese prévia, ora operar por si mesmo, é o fato de que os alelos *HTT* normais apresentam tamanhos de repetições CAG menores entre sujeitos de populações asiáticas do que entre os provenientes de populações europeias (Squitieri, et al., 1994). Pouco se sabe sobre a distribuição dos alelos normais entre latino-americanos.

Como em outras doenças mendelianas, a doença de Huntington está sujeita a concentrações populacionais elevadas decorrentes de efeitos fundadores. Na América Latina, a já mencionada região ao redor do lago Maracaibo na Venezuela e também a região de Juan Acosta na Colômbia são exemplos de isolados geográficos, nos quais até hoje convive a maioria dos descendentes de um ancestral comum e portador de HD. No Maracaibo, por exemplo, estima-se que a prevalência da HD seja de 700/100.000 (Ávila-Girón, 1973). À exceção das descrições destes isolados geográficos, estudos de frequência da HD na América Latina são raros. Paradisi et al 2008, por exemplo, avaliaram a prevalência da HD no restante da população venezuelana e encontraram uma prevalência baixa, de 0,5/100.000 (Paradisi, et al., 2008).

A prevalência da HD parece estar aumentando em países de origem europeia nas últimas décadas (Pringsheim, et al., 2012). Esse aumento pode ser ilusório e se deve provavelmente a vários fatores confundidores: maior

conhecimento sobre a doença por parte dos médicos, facilidade no acesso ao diagnóstico molecular e aumento da longevidade em geral e da sobrevivência da doença em particular. No entanto, não se descarta que forças evolutivas estejam operando em favor de uma certa seleção positiva, ou de que as taxas de mutação *de novo* estejam aumentando por algum motivo, levando a um aumento correspondente na incidência (Rawlins, et al., 2016).

1.3 Manifestações clínicas

A doença de Huntington é uma enfermidade neurodegenerativa autossômica dominante, caracterizada por uma constelação de sintomas neurológicos, psiquiátricos e comportamentais. A idade de início é variável e depende em grande parte do número de repetições CAG. Os indivíduos portadores da mutação podem tornar-se sintomáticos em qualquer idade, mas a média varia entre 30-50 anos (Ross, et al., 2014).

A transição do período pré-sintomático para o sintomático é sutil; nesse período o indivíduo apresenta sintomas neuropsiquiátricos e alterações discretas da personalidade, da cognição e do controle motor (Paulsen, et al., 2008; Martinez-Horta, et al., 2016). Com a progressão da doença, manifestações cognitivas acentuam-se, como a perda de capacidade de julgamento. Inicialmente a perda de memória não é a habilidade cognitiva mais comprometida, mas com a evolução uma síndrome demencial subcortical por fim estabelece-se. Depressão e ansiedade são frequentes e a taxa de suicídio é elevada entre indivíduos com HD. Um registro europeu de indivíduos com o diagnóstico de HD estimou em 9,9% a incidência de suicídio em quatro anos (Hubers, et al., 2013). Indivíduos portadores assintomáticos também apresentam risco aumentado de suicídio comparado à população geral (Paulsen, et al., 2005).

A coreia é a manifestação mais óbvia e em geral é o que leva à suspeita diagnóstica, apesar de não se correlacionar bem com a progressão da doença (Mahant, et al., 2003). As alterações no controle motor pioram com a progressão e contribuem para a dependência do paciente. O controle oculomotor também está comprometido, sob a forma de sacadas lentas e hipométricas e problemas de fixação (Hicks, et al., 2008).

Nos indivíduos com início dos sintomas antes dos 20 anos de idade (cerca de 5-10% dos casos), a coreia pode não ser a manifestação motora mais óbvia e sim, uma síndrome parkinsoniana rígido-acinética. Esse fenótipo é conhecido como variante de Westphal (Siesling, et al., 1997). Finalmente, uma síndrome demencial pura, não associada a manifestações motoras, pode ser a manifestação única em indivíduos com idade de início acima de 60 anos. Estes casos podem ser confundidos com outras demências neurodegenerativas mais ou menos comuns (Lipe, et al., 2009).

Diversos achados não neurológicos foram descritos, como perda de peso, atrofia da musculatura esquelética, alterações no sono e disfunção autonômica (Van Der Burg, et al., 2009).

Manifestações extra neurológicas - perda de peso

A perda de peso é uma das manifestações clínicas mais frequentes da HD. A perda é progressiva e surge já nos indivíduos portadores assintomáticos (Djousse, et al., 2002). Um estudo mostrou perda de peso mais acelerada em indivíduos com CAGexp mais longas (Aziz, et al., 2008). A causa da perda de peso nos indivíduos portadores de HD não é clara, mas não parece estar associada a baixa ingestão calórica, já que surge antes do período sintomático da doença e mesmo nos indivíduos com ingestão calórica elevada (Marder, et al., 2000; Trejo, et al., 2004). Ela também não parece estar associada ao estado hipercinético causado pela coreia, já que se agrava nos estágios mais avançados da doença, quando a coreia já é menos presente (Djousse, et al., 2002).

Assim, a perda de peso parece ser um evento independente das manifestações neurológicas da HD, e sugere que a CAGexp no *HTT* produza alterações no metabolismo energético dos portadores. A fisiopatologia da disfunção energética na HD será tema de sessões a seguir.

1.4 Diagnóstico diferencial

Até a descoberta do gene causador da doença de Huntington em 1993 (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993), o diagnóstico era realizado através da síndrome clínica característica (coreia, alterações comportamentais e cognitivas de caráter progressivo) e uma história familiar autossômica dominante. Entretanto, a partir de 1993, a avaliação molecular das famílias diagnosticadas previamente com HD revelou duas situações imprevistas: (1) indivíduos com CAGexp no *HTT* mas sem história familiar; e (2) famílias e indivíduos com síndrome clínica característica e história familiar autossômica dominante, mas que não apresentavam CAGexp no *HTT* (Andrew, et al., 1994). Dessa forma, reconheceu-se que nem sempre a herança dominante está presente na HD, e que outras doenças genéticas poderiam apresentar-se com o fenótipo classicamente associado à HD.

As condições genéticas que se apresentam com fenótipos semelhantes à HD são conhecidas de forma conjunta como *Huntington's disease-like syndromes* (HDLs) e perfazem um conjunto heterogêneo de doenças neurodegenerativas de herança tanto autossômica recessiva como dominante. Como denominador comum, as HDLs apresentam-se com demência, coreia e alterações comportamentais. As características clínicas adicionais (ataxia, parkinsonismo, distonia, por exemplo), idade de início e etnia do paciente podem sugerir o diagnóstico (Martino, et al., 2013). Entre as causas dominantes, incluem-se a expansão patológica no gene que codifica a proteína priônica (*PRNP*), condição conhecida como HDL-1 (Moore, et al., 2001); a expansão CTG no gene que

codifica a proteína junctofilina-3 (conhecida como HDL-2) (Margolis, et al., 2001); a expansão CAG no gene que codifica a proteína TATA box-binding (*TBP*), no gene associado à ataxia espinocerebelar tipo 17 – SCA17 (conhecida com HDL-4) (Toyoshima, et al., 2004). Expansões CAG nos genes causadores das ataxias espinocerebelares tipo 1 (SCA1), tipo 2 (SCA2), tipo 3 (SCA3), tipo 7 (SCA7) e atrofia dentato-rubro-palido-luisiana (DRPLA) podem apresentar-se com fenótipo HDL (Nagafuchi, et al., 1994; Wu, et al., 2004; Geschwind, et al., 1997; Pedroso, et al., 2014; Schmitz-Hubsch, et al., 2008). Além disso, mutações no gene da cadeia leve da ferritina (causa da Neuroferritinopatia, uma forma de *neurodegeneration with brain iron accumulation*, NBIA) podem se apresentar com coreia e alteração cognitiva (Curtis, et al., 2001). Por fim, a Coreia-acantocitose (mutações recessivas no gene *VPS13A*) e a síndrome de McLeod (doença recessiva ligada ao X, gene *XK*) podem se manifestar como síndrome coreica (Rampoldi, et al., 2001; Walker, et al., 2007). Recentemente, a expansão da sequência do hexanucleotídeo GGGGCC no *C9orf72* revelou-se causa frequente de HDLs em uma série de casos europeia, presente em 1,95% dos casos fenótipo HD (Hensman Moss, et al., 2014).

Nas diversas séries de pacientes com fenótipo HDL nos quais a expansão no *HTT* foi descartada, o diagnóstico etiológico foi determinado na minoria dos casos (1-3%) (Wild, et al., 2008; Costa, et al., 2006; Stevanin, et al., 2003). A exceção até o momento seria a série de HDL de origem negra e da África do Sul, onde o HDL-2 foi identificado em 30% dos casos (Krause, et al., 2015). Na América Latina, séries de casos HDL foram estudados muito escassamente. Nas duas séries de casos publicadas até o momento, o diagnóstico de HDL-2 foi o mais frequente. Rodrigues et al 2011 estudaram 29 indivíduos com fenótipo Huntington-like e encontraram 3 (10,3%) com HDL-2 e 2 (6,8%) com Coreia-acantocitose (Rodrigues, et al., 2011). Paradisi et al 2013 avaliaram 16 indivíduos com fenótipo Huntington-like na Venezuela e em 4 (25%) o diagnóstico foi HDL-2 (Paradisi, et al., 2013). Como a HDL-2 foi descrita somente em indivíduos com ancestralidade africana (Margolis, 2012), é possível que, em populações latino-

americanas, a HDL-2 seja o diagnóstico mais frequente em indivíduos com fenótipo HDL e que não apresentem CAGexp no *HTT*.

1.5 Escalas clínicas na doença de Huntington

A escala UHDRS (Unified Huntington's Disease Rating Scale) é o instrumento de medida mais utilizado para acompanhar a evolução dos pacientes com HD. É uma escala composta de quatro subdivisões, cada uma dela com seu próprio escore, ou seja, não há um escore total final para a escala, mas escores totais para suas subescalas: a) escore motor, b) escore cognitivo, c) escore comportamental e d) escore funcional (Huntington Study Group, 1996; Siesling, et al., 1998) (Tabela 1). A UHDRS permite a avaliação dos portadores de HD em quatro domínios descritos a seguir.

a) Avaliação motora

É calculada a partir do somatório de 31 itens relacionados a diversos aspectos da função motora. Em cada item há cinco opções, variando de 0 a 4, sendo que 4 indica prejuízo maior.

b) Avaliação cognitiva

Avaliada através de três testes: fluência verbal fonológica (FAS); *Symbol Digit Modalities Test*; teste de Stroop. As respostas corretas de cada teste são somadas e valores mais elevados correspondem a um melhor desempenho.

c) Avaliação comportamental

Realizada através do produto da gravidade e frequência (de 0 a 4, sendo 4 mais grave) em cada item de um questionário composto de

várias manifestações neuropsiquiátricas. Escores maiores indicam mais comprometimento.

d) Avaliação funcional

Avaliada através de três escalas. Cada escala possui um escore diferente e não são somados. 1) *Functional Assessment*: lista de 21 itens relacionados a atividades da vida diária; no somatório, um escore maior indica menos incapacidade; 2) *Independence Scale*: escala com dez itens (10 a 100) indicando maior dependência quanto menor o escore; 3) *Functional Capacity*: Somatório de cinco aspectos funcionais (emprego, finanças, cuidados com a casa, atividade da vida diária e nível de cuidado). Varia de 0-13 e quanto menor o escore, maior a incapacidade.

Tabela 1. Estrutura resumida da UHDRS (Huntington Study Group, 1996)

Dimensão		Nº de itens	Escore possíveis
Avaliação motora		31	0 (melhor) a 124 (pior)
Avaliação cognitiva		5	0 (pior) > 300 (melhor)
Avaliação comportamental		16	0 (melhor) a 93 (pior)
Avaliação funcional	<i>Independence Scale</i>	10	10 (pior) a 100 (melhor)
	<i>Functional Assessment</i>	25	0 (pior) a 25 (melhor)
	<i>Total Functional Capacity</i>	5	0 (pior) a 13 (melhor)

1.6 História natural da doença de Huntington

A doença de Huntington tem um curso lento e progressivo e pode ser dividido em fases pré-sintomática (também chamada de pré-manifesta) e sintomática. Durante o período pré-sintomático, os portadores da CAGexp no *HTT* são indistinguíveis de indivíduos não portadores. Na medida em que as alterações motoras, cognitivas e comportamentais aparecem, sua progressão é inexorável (Paulsen, et al., 2008; Tabrizi, et al., 2012).

Como foi dito anteriormente, a partir da década de 90, grandes coortes (algumas multicêntricas) de indivíduos HD começaram a ser formadas e definiram a história natural da doença. O estudo COHORT (*Cooperative Huntington's Observational Research Trial*), por exemplo, seguiu 248 indivíduos pré-sintomáticos e 1514 sintomáticos de 2006 a 2011 em centros dos Estados Unidos, Canadá e Austrália. A progressão da doença foi avaliada em subgrupo dessa coorte (334 indivíduos): a escala *Total Functional Capacity* diminuiu 0,6 pontos por ano e o escore motor total aumentou 3 pontos por ano (Dorsey, et al., 2013). O estudo REGISTRY, formado por centros de vários países europeus, organizado pela European Huntington's Disease Network (EHDN), segue até o momento quase 10.000 indivíduos sintomáticos e em risco (Orth, et al., 2010). Uma amostra de 379 indivíduos sintomáticos foi acompanhada por ao menos 2 anos; nesses indivíduos, o escore motor total variou 4,7 pontos ao ano e *Total Functional Capacity* reduziu 0,44 pontos anualmente (Meyer, et al., 2012).

CAP (CAG age product) score

A idade de início dos sintomas motores na HD é variável, mas fortemente dependente do número de repetições CAGexp (Langbehn, et al., 2010); além disso, também a progressão da doença poderia ser influenciada pelo CAGexp. Como uma forma de estimar a progressão da patologia HD em função da CAGexp e do tempo que a pessoa é exposta aos efeitos da expansão, Penney et al 1997 propuseram a fórmula: Idade atual x (CAG x Constante). Os autores mostraram que esse índice foi um bom preditor da patologia estriatal em

pacientes HD na autópsia (Penney, et al., 1997). Ross et al 2014 sugeriram pequena mudança na fórmula e denominaram a resultante de CAP score (de “CAG age product”) (Ross, et al., 2014). Diversas modificações desse índice foram criadas e utilizados como critério de entrada em coortes (Paulsen, et al., 2008;Tabrizi, et al., 2009). Na medida em que os CAP scores passaram a ser utilizados em estudos de HN, no entanto, as evidências obtidas apontaram para um efeito menor da CAGexp sobre a velocidade de progressão da doença (Rosenblatt, et al., 2012).

1.7 Biomarcadores na doença de Huntington

Biomarcadores são marcadores de um processo biológico subjacente, seja a presença de determinada doença (*trait biomarker*), a progressão da doença (*state biomarker*) ou a resposta a um tratamento (*pharmacological biomarker*) (Andre, et al., 2014). A doença de Huntington tem seu *trait biomarker* na própria CAGexp no *HTT*, uma vez que esta é a única mutação causal até hoje identificada e que pode ser facilmente identificada em laboratórios de biologia molecular. Em contraste, ainda há pouca evidência que constitua, com segurança, variáveis em biomarcadores de gravidade e de resposta a tratamento na HD. A escala UHDRS tem sido usada como o marcador *gold-standard* de gravidade da HD, por sua associação direta com os achados clínicos e com as incapacidades sofridas, e pelo acúmulo de conhecimento a respeito da progressão de seus escores no tempo. Porém, como a doença progride lentamente, especialmente nas fases iniciais, a sensibilidade dessa escala não será suficiente para ser usada em ensaios clínicos (EC) de duração e tamanho usuais. ECs que utilizem a UHDRS como desfecho primário necessitarão de um número elevado de participantes e ou de uma longa duração das observações. Em vista da raridade da HD, serão pouco factíveis (Dorsey, et al., 2013). Por isso, a busca por biomarcadores de gravidade e de resposta a tratamento na HD tem sido intensa

na última década e tem recebido incentivos financeiros vultosos, especialmente em grandes coortes multicêntricas. Os estudos PREDICT-HD e TRACK-HD, por exemplo, identificaram vários potenciais biomarcadores de imagem e clínicos nas fases prodrômicas e iniciais da HD (Paulsen, et al., 2014;Tabrizi, et al., 2013). Resta saber se são factíveis e se se confirmam em coortes de origens étnicas diversas das originais.

1.8 Alterações no metabolismo energético na doença de Huntington.

A HD é uma doença autossômica dominante e, como revisaremos a seguir (item 1.9), seu mecanismo patogênico mais aceito envolve o ganho de função tóxica devido à presença da uma poliglutamina na proteína huntingtina (Shao, et al., 2007;Tobin, et al., 2000). Um dos mecanismos patogênicos que levam à neurodegeneração e às manifestações clínicas é o comprometimento no metabolismo energético (Browne, 2008). A disfunção energética observada está intimamente relacionada à disfunção mitocondrial e ao estresse oxidativo causado pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (Stack, et al., 2008).

A observação da perda de peso que os indivíduos portadores da CAGexp apresentam sugere a presença de um estado pró-catabólico, já que surge mesmo antes do aparecimento dos sintomas neurológicos (Djousse, et al., 2002;Sanberg, et al., 1981;Pratley, et al., 2000). Essa tendência à caquexia, que surge sutilmente em portadores assintomáticos e vai se agravando com a progressão da doença, não parece estar relacionada à presença de coreia, ou seja, de um aumento no consumo energético (Djousse, et al., 2002;Robbins, et al., 2006). Tampouco parece ser explicada por uma eventual anorexia, já que os portadores consomem mais calorias do que os não portadores (Trejo, et al., 2004;Mochel, et al., 2007). Além disso, a perda de peso parece correlacionar-se com o tamanho da expansão CAG (Aziz, et al., 2008).

O comprometimento do metabolismo energético na doença também é visto através das evidências de redução do metabolismo da glicose cerebral em indivíduos sintomáticos (Kuwert, et al., 1990;Feigin, et al., 2001); da geração reduzida de ATP na musculatura dos indivíduos sintomáticos (Lodi, et al., 2000) e assintomáticos (Saft, et al., 2005); e da disfunção de alguns componentes do ciclo do ácido tricarboxílico em estudos pós-morte (Browne, et al., 1997).

1.9 Carnitina e aminoácidos cadeia ramificada (AACR) na doença de Huntington

Os aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) valina, leucina e isoleucina são aminoácidos essenciais obtidos exclusivamente pela dieta. Participam da síntese proteica (no músculo em particular) e regulam várias etapas do metabolismo intermediário, especialmente através da via do mTOR (Zhang, et al., 2017). Cerca de 20% do metabolismo dos AACRs ocorre no cérebro (Suryawan, et al., 1998). Potenciais associações entre os AACRs e a HD foram investigadas desde a década de 60 (Perry, et al., 1969;Phillipson, et al., 1977). Como as técnicas de detecção de aminoácidos ao longo das últimas décadas foram aperfeiçoadas de forma significativa, os estudos iniciais são pouco comparáveis com aos mais recentes (tabela 2). Além disso, como aqueles estudos dependeram de diagnósticos de HD exclusivamente clínicos (o *HTT* viria a ser descoberto apenas em 1993), a possibilidade de inclusão de doenças cujas características são semelhantes à doença de Huntington (Huntington's disease-like 1, Huntington's disease-like 2, Huntington's disease-like 4, ataxia espinocerebelar tipo 17, atrofia dentato-rubro-palido-luisiana – DRPLA), apesar de pequena, existe e poderia ter confundido os resultados. Em geral, esses primeiros estudos mostraram uma redução dos níveis plasmáticos dos AACRs, apesar de algumas inconsistências entre eles. Níveis reduzidos de valina foram vistos por alguns (Perry, et al., 1969;Phillipson, et al., 1977;Perry, et al., 1972;Oepen, et al., 1982), mas não por outros (Watt, et al., 1978;Reilmann, et al., 1995). Os níveis de isoleucina estavam reduzidos em todos e os de leucina em quase todos esses

estudos. Em comum, esses estudos iniciais incluíram pacientes HD em estágios mais graves da doença, muitos deles institucionalizados (tabela 2). A partir da descoberta do *HTT* em 1993 (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993), observações puderam incluir não somente pacientes com diagnóstico de HD mas também portadores assintomáticos. Underwood et al 2006 avaliaram 30 indivíduos portadores da expansão CAG (10 assintomáticos) e verificaram redução dos níveis de valina, leucina+isoleucina nesses indivíduos, porém sem diferença em relação ao status sintomático (Underwood, et al., 2006). Resultado semelhante encontraram Mochel et al 2007, avaliando 32 portadores (15 assintomáticos): houve redução de todos os AACRs em portadores, mas sem diferença entre assintomáticos e sintomáticos (Mochel, et al., 2007). O mesmo grupo avaliou um número maior de indivíduos sintomáticos (70) e não encontrou correlação dos AACRs e escalas de gravidade, medida pela UHDRS (Mochel, et al., 2011). Gruber et al 2013, de forma semelhante, não encontraram correlação dos níveis de AACRs com as subescalas da UHDRS, apesar de que os níveis de leucina estavam reduzidos em relação aos controles (Gruber, et al., 2013). Mais recentemente, Cheng et al 2016, apesar de encontrarem redução dos AACRs em portadores sintomáticos, não identificaram correlação com escalas de gravidade (UHDRS) ou diferença do grupo portador assintomático e controles (Cheng, et al., 2016). Mastrokolas et al 2016 também não encontraram diferença entre os grupos (portador sintomático, assintomático e controle) ou correlação com escalas de gravidade (UHDRS) (Mastrokolas, et al., 2016) (ver tabela 2). Por fim, Nambron et al 2016, não encontraram alterações nos AACRs em indivíduos assintomáticos e sintomáticos em comparação com controles (Nambron, et al., 2016).

As carnitinas são moléculas que participam do metabolismo intermediário, tem papel importante no transporte transmembrana de ácidos graxos e conseqüentemente na facilitação da beta-oxidação e produção de ATP. A maior parte da carnitina é obtida da dieta, especialmente da carne vermelha e do leite

(Walter, 1996). O perfil da carnitinas na doença de Huntington foi estudado de forma mais escassa. Cuturic et al 2013 avaliaram os níveis séricos de várias carnitinas em 23 pacientes HD institucionalizados e encontraram níveis reduzidos de carnitina total, livre e acilcarnitina em 26% (6/23) dos pacientes. Os autores ainda realizaram a reposição oral da carnitina de forma aberta nos pacientes com deficiência e perceberam melhora comportamental nos pacientes, apesar de o efeito ser temporário (Cuturic, et al., 2013). Mastrokolas et al 2016 avaliaram sete carnitinas, dentro de um painel metabólico amplo, em indivíduos portadores assintomáticos, sintomáticos e controles e não encontraram diferença entre os grupos (Mastrokolas, et al., 2016).

Tabela 2. Estudos que avaliaram os AACRs e carnitinas em indivíduos portadores da expansão CAG no gene *HTT*

Carnitinas									
	Portadores sintomáticos	Portadores assintomáticos	Não portadores	Gravidade dos pacientes HD	Desenho do estudo	Substâncias estudadas	Tipo de amostra	Método laboratorial	Resultados
(Cuturic, et al., 2013)	23	-	-	institucionalizados	Transversal	Carnitina total, livre e acilcarnitina	Soro	Não descrito	6 (26%) tinham níveis baixo de todas as formas de carnitina.
(Mastrokolas, et al., 2016)	68	29	36	- graves (TFC < 5) ^a - não graves (TCF entre 7-13)	Transversal	7 carnitinas, valina, isoleucina e leucina ^b	Plasma	Espectrometria de massa em tandem	Sem diferença entre grupos.
Aminoácidos de Cadeia Ramificada (valina, leucina e isoleucina)									
(Perry, et al., 1969)	19 ^c	-	20	10/19 institucionalizados	Transversal	Valina, isoleucina e leucina ^d	Plasma e líquido	Cromatografia com troca iônica	Níveis plasmáticos reduzidos de todos os AACRs; níveis líquidos reduzidos de valina e leucina.
(Perry, et al., 1972)	31 ^c	31 ^e	28	19/31 institucionalizados	Transversal	Valina, isoleucina e leucina ^d	Plasma	Cromatografia com troca iônica	Níveis de todos os AACRs reduzidos em pacientes. Nos indivíduos em risco, semelhante ao grupo controle.
(Phillipson, et al., 1977)	8 ^c	-	8	Não especificado	Transversal	Valina, isoleucina e leucina ^f	Plasma	Cromatografia com troca iônica	Redução dos níveis de todos os AACRs.
(Watt, et al., 1978)	9 ^c	-	9	Institucionalizados	Transversal	Valina, isoleucina e leucina ^d	Plasma	Cromatografia com troca iônica	Níveis reduzidos de leucina e isoleucina. Níveis de valina não foram diferentes do grupo controle.
(Oepen, et al., 1982)	12 ^c	8 ^e	16	Não especificado	Transversal	Valina, isoleucina e	Líquor	Cromatografia com troca	Redução de todos os AACRs tanto nos pacientes como nos indivíduos

						leucina ^d		iônica	em risco.
(Reilmann, et al., 1995)	16 ^c	-	21	Não especificado	Transversal	Valina, isoleucina e leucina ^d	Plasma	HPLC	Níveis de isoleucina reduzidos. Valina e leucina semelhantes ao grupo controle.
(Underwood, et al., 2006)	20	10	20	UHDRS ^g Total Motor Score entre 11 e 70	Transversal	Valina, isoleucina e leucina ^b	Sangue total	Espectrometria de massa em tandem	Níveis de todos os AACRs estavam reduzidos nos portadores (sem diferença entre sintomáticos e assintomáticos).
(Mochel, et al., 2007)	17	15	21	TFC ^a entre 8 e 13.	Transversal	Valina, isoleucina e leucina ^h	Plasma	1H NMR spectroscopy e cromatografia por troca iônica	Níveis de todos os AACRs estavam reduzidos em pacientes HD, mas não em portadores assintomáticos, quando comparado com controles.
(Mochel, et al., 2011)	70	16	21 ⁱ	Pacientes em estágios leves, moderados e graves da doença	Transversal	Valina, isoleucina e leucina	Plasma	1H NMR spectroscopy e cromatografia por troca iônica	Níveis dos AACRs reduzidos em pacientes e níveis de leucina reduzidos em portadores assintomáticos, quando comparado com controles.
(Gruber, et al., 2013)	24	6	29	Indivíduos em todos os estágios da doença	Transversal	Valina, isoleucina e leucina ^d	Plasma	HPLC ^j	Os AACRs não se correlacionaram com escalas de gravidade (UHDRS), embora os níveis de leucina estejam reduzidos em pacientes HD.
(Cheng, et al., 2016)	29	8	47	Média TFC=9,86	Transversal	40 acilcarnitinas	Plasma	Espectrometria de massa em tandem	Níveis de valina e isoleucina reduzidos em pacientes comparado com controles. Não houve correlação com UHDRS. Em portadores assintomáticos

									iguais aos controles.
(Mastrokolas, et al., 2016)	68	29	36	- graves (TFC < 5) ^a - não graves (TFC entre 7-13)	Transversal	7 carnitinas, valina, isoleucina e leucina ^b	Plasma	Espectrometria de massa em tandem	Sem diferença entre grupos.
(Nambron, et al., 2016)	13	14	15	Média TFC=8	Transversal	Valina, isoleucina e leucina ^d	Plasma	HPLC e cromatografia por troca iônica	Sem diferença entre grupos.

^a Total Functional Capacity: escala de funcionalidade da HD. Varia entre 0-13; ^b dentro de uma painel metabólico extenso; ^c diagnóstico clínico e pela história familiar; ^d painel com diversos aminoácidos; ^e indivíduos em risco de desenvolver HD; ^f além de outros aminoácidos, ácidos graxos não esterificados, glicemia e insulina; ^g subescala da UHDRS que mede os sinais motores da HD, varia entre 0 a 124; ^h avaliação extensa, incluindo diversos aminoácidos, IGF1, interleucinas, função endócrina, grelina, leptina e acilcarnitina; ⁱ mesmo grupo controle de Mochel, et al., 2007; ^j High Performance Liquid Chromatography

1.10 Aspectos genéticos

A sequência repetitiva CAG no gene *HTT*

Como dissemos anteriormente, a doença de Huntington é causada pela expansão de uma sequência repetitiva do trinucleotídeo CAG no éxon 1 do gene *HTT*, sendo esse o único gene associado à HD (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Indivíduos normais apresentam alelos com sequências CAG entre 10 e 35 repetições, enquanto os afetados apresentam alelos com mais de 36 repetições (Kremer, et al., 1994) (tabela 3). Como a HD tem herança autossômica dominante, basta a presença de um alelo com CAGexp para a doença manifestar-se. Além disso, o alelo menor (expandido ou não) não parece ter influência na idade de início ou progressão da doença (Lee, et al., 2012). Isso significa que os indivíduos com dois alelos expandidos (mutação bialélica ou homocigoto) não se diferenciam significativamente dos indivíduos heterocigotos com relação à idade de início, o que sugere que a presença de um alelo expandido é suficiente para determinar os mecanismos patogênicos que levam ao surgimento dos sintomas motores (Lee, et al., 2012).

O número de repetições no CAGexp e a idade de início dos sintomas (assim como em outras poliglutaminopatias) estão inversamente relacionados; ou seja, repetições maiores determinam idades de início mais precoces (Duyao, et al., 1993; Stine, et al., 1993). O tamanho da CAGexp é responsável por cerca de 60% da variação na idade de início, sendo o restante relacionado aos hipotéticos efeitos de genes modificadores e do ambiente (Wexler, et al., 2004; Rosenblatt, et al., 2001).

A CAGexp introduz um segmento expandido de glutaminas (poliglutamina ou poliQ) próximo à extremidade 5' da proteína *huntingtina*. O mecanismo patogênico mais aceito envolve o ganho de função tóxica devido à presença de uma poliglutamina na proteína *huntingtina* (Shao, et al., 2007; Tobin, et al., 2000).

A inclusão do segmento de poliglutamina expandido (poliQ) na extremidade N-terminal leva a alterações de sua conformação (especialmente estruturas β -sheet) e posterior incapacidade de degradação pelos sistemas ubiquitina-proteassoma e da autofagia. Essa incapacidade de degradação da huntingtina má formada resulta tanto em seu acúmulo (identificado sob a forma de inclusões citoplasmáticas e nucleares) com em uma cascata de eventos patogênicos relacionados a vários processos celulares e moleculares, como excitotoxicidade, alteração na transcrição e sinalização intracelular e alterações no metabolismo energético (Ross, et al., 2011).

Tabela 3. Tipos de alelos possíveis no gene *HTT* e sua relação com a doença de Huntington.

Tipo de Alelo	Nº de repetições	Risco para o portador	Risco de expansão
Normais	≤ 26	Não	Não
Intermediários	27-35	Não	Sim
Penetrância incompleta	36-39	Penetrância incompleta	Sim
Penetrância completa	≥ 40	Penetrância completa	Sim

O surgimento, instabilidade e manutenção da sequência repetitiva CAG

Mesmo antes da descoberta do gene causador da HD em 1993, conhecia-se o fenômeno da antecipação, ou seja, nas gerações subsequentes a idade de início se reduzia progressivamente (Myers, et al., 1982). A explicação mais prevalente residia nos vieses de observação. Após 1993, demonstrou-se que esse fenômeno estava associado ao um aumento subsequente da CAGexp na prole, especialmente quando o progenitor era do sexo masculino (Kremer, et al.,

1995). A instabilidade da CAGexp ao atravessar meioses foi observada em várias coortes HD, tanto no sentido das contrações como, e mais frequentemente, no sentido de maiores expansões. Na América Latina, as transmissões CAGexp foram descritas de forma mais extensa no isolado geográfico de Maracaibo. Wheeler et al 2007, estudando 495 transmissões (311 maternas e 184 paternas) verificaram tendência tanto à instabilidade (82% nas paternas e 69% nas maternas) quanto a expansões (65% nas paternas e 34,5% nas maternas) (Wheeler, et al., 2007). Dessa forma, intuiu-se que haveria uma tendência à expansão progressiva da CAGexp e à geração de indivíduos com idades de início progressivamente menores, com redução de seu fitness e eventual suspensão de sua descendência. Isso levaria por fim a uma redução da incidência e da prevalência da doença na população. Entretanto, fenômeno contrário parece estar ocorrendo; existe a sugestão de um aumento da prevalência da HD em países com predomínio de população de descendência europeia em alguns (Rawlins, et al., 2016) mas não em todos os estudos de frequência (Wexler, et al., 2016). Como já discutimos, vários fatores podem operar como confundidores e sugerir mudanças de frequência que talvez não estejam presentes, como a disponibilidade maior da testagem molecular e maior identificação de indivíduos sem história familiar e em idosos, e a expectativa de vida maior da população em geral e nos pacientes HD em particular (Rawlins, et al., 2016). De toda sorte, a frequência da HD parece estar pelo menos estável ao longo do tempo, contrariando as expectativas de uma redução de seu fitness associadas à antecipação. Essa manutenção da HD na população também poderia ser explicada pela manutenção de um pool de indivíduos com alelos de penetrância reduzida (36 a 39 repetições) e alelos intermediários grandes (27-35 repetições), o que explicaria o surgimento de casos de novo (Myers, et al., 1993). Em resumo, as forças seletivas ou estocásticas subjacentes às tendências populacionais permanecem pouco compreendidas, no caso da HD.

Capítulo 2. Justificativas, hipóteses e objetivos

A HD é uma das doenças genéticas mais estudadas do mundo, tendo recebido aportes financeiros privados elevados e a formação de consórcios internacionais. O frágil conhecimento da doença no Brasil e na AL contrasta com o cenário do hemisfério norte.

A HD tem a dimensão individual, que sua carga neurológica e de início tardio, e a dimensão da genética formal, que envolve a sua manutenção no pool populacional. Enquanto a fisiopatologia da primeira se dá no cenário do neurônio, os mecanismos celulares da segunda podem envolver múltiplos tecidos e fases celulares precoces na vida do sujeito que resultem em vantagens seletivas.

Os estudos sobre a dimensão populacional têm sido relativamente reduzidos e ainda assim partem de dois ou três grupos multinacionais importantes. Esses grupos focaram na investigação dos haplótipos ancestrais para explicar a manutenção da HD entre europeus. O estudo dos aspectos da transmissão do CAGexp foi menor e aparentemente "negligenciado", resultando em ambiguidades na literatura a respeito desse tema.

O fenótipo HD é principalmente causado pela CAGexp no *HTT*, nas populações bem estudadas (Europa e EUA). HD-likes têm se somado, no entanto, e um dos HD-likes, o HDL2, tem origem africana, o que levanta a hipótese de frequências diferenciais dessas doenças, nas diferentes populações.

Os consórcios internacionais (COHORT, REGISTRY) praticamente já liquidaram as dúvidas sobre a HN (a progressão da doença) da *HTT* e hoje em dia focam em duas questões a respeito de suas manifestações neurológicas tardias: na descoberta de biomarcadores e em tratamentos modificadores de doença. Nesse cenário, é bastante difícil alcançar originalidade universal a partir de estudos feitos em coortes *HTT* iniciais na AL. Mesmo assim, tentamos identificar "vazios de conhecimento" sobre a HD onde tivéssemos alguma expertise.

Assim, o presente estudo se justifica pela escassez de conhecimento da HD no Brasil e na América Latina, tanto de sua prevalência quanto de suas características genéticas, como perfil de transmissão intergeracional do alelo CAGexp. Além disso, persistem dúvidas sobre a transmissão CAGexp e sua relação com a persistência da doença na população. Por fim, a ausência de biomarcadores no sangue periférico que possam ser sensíveis à progressão da doença ou à resposta terapêutica faz com que seu estudo seja de importância no contexto de possíveis drogas modificadoras do curso da doença.

As hipóteses da presente tese podem ser resumidas da seguinte forma:

- as mutações no gene *HTT* seriam a principal causa do fenótipo doença de Huntington no Brasil;
- as instabilidades do CAGexp ao atravessar meioses aconteceriam tanto no sentido de expansões como no de contrações, em iguais proporções, na nossa população. As contrações poderiam permitir a geração de sujeitos assintomáticos e bem adaptados, ainda que heterozigotos, tornando-os um “reservatório” da mutação na população geral;
- as meioses estariam associadas a maiores instabilidades do CAGexp nos gametas, na medida em que o indivíduo envelhece;
- a carnitina livre e os aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina teriam padrões diferentes entre indivíduos com a CAGexp no *HTT* e controles, e acompanhariam a progressão da doença, podendo ser candidatos a biomarcadores de progressão.

Com essas hipóteses, os objetivos do presente estudo foram inicialmente:

- revisar o estado da arte sobre a doença de Huntington na América Latina, usando como ferramenta a revisão sistemática, para definir o que se sabe sobre a HD no nosso continente e nos nossos grupos populacionais;
- determinar qual a proporção de casos com fenótipo doença de Huntington é de fato portadora de expansões no gene *HTT*.

Após definirmos que as mutações no *HTT* representam uma proporção substancial dos casos, foram também objetivos da presente tese estudar aspectos individuais e de transmissão CAGexp, ao:

- definir se as transmissões CAGexp obtidas da coorte *HTT* produzem prole com tamanhos de CAGexp estável ou instável, estimando a frequência de expansões e contrações no CAGexp;
- estimar se a idade do genitor está associada à piora das instabilidades observadas na prole;
- descrever as manifestações neurológicas dos portadores *HTT* sintomáticos brasileiros, bem como a progressão das mesmas em um ano, através da escala UHDRS;
- descrever o IMC e sua progressão em um ano, nos portadores *HTT* sintomáticos brasileiros;
- descrever as concentrações séricas da carnitina livre, valina, leucina e isoleucina, e suas progressões em um ano, nos portadores *HTT* sintomáticos brasileiros;
- definir se as progressões desses candidatos a biomarcadores acompanham a piora neurológica e podem superar a sensibilidade da escala UHDRS na descrição da progressão da doença.

Capítulo 3. Genetic aspects of Huntington's disease in Latin America. A Systematic Review

Artigo publicado no periódico Clinical Genetics (fator de impacto 3,892), março de 2016, vol. 89(3), pg 295-303.

Capítulo 4. Huntington disease and Huntington disease-like in a case series from Brazil

Artigo publicado no periódico Clinical Genetics, outubro de 2014, vol 86(4), pg 373-3

Capítulo 5. Minimal prevalence of Huntington disease in Brazil and instability of the CAG expanded tract transmissions

Manuscrito a ser submetido.

Minimal prevalence of Huntington disease in Brazil and instability of the CAG expanded tract transmissions

Raphael Machado de Castilhos ^{1, 13, 14}, José Augusto dos Santos ^{6, 13}, Marina Coutinho Augustin ^{6, 13}, José Luiz Pedroso ⁷, Orlando Barsottini ⁷, Roberta Saba ⁷, Henrique Ballalai Ferraz ⁷, Clécio Godeiro Junior ⁸, Fernando Regla Vargas ⁹, Diego Zanotti Salarini ¹⁰, Gabriel Vasata Furtado ^{1, 13}, Marcia Polese-Bonato ^{2, 13}, Luiza Paulsen Rodrigues ^{3, 13}, Lucas Schenatto Sena¹, Maria Luiza Saraiva-Pereira ^{1, 2, 3, 4, 11, 12, 13}, Laura Bannach Jardim ^{1, 5, 6, 11, 12, 13, 14}, on behalf of Rede Neurogenética.

Programa de Pós-graduação em ¹ Genética e Biologia Molecular, em ² Bioquímica e em ³ Biologia Celular e Molecular, Departamentos de ⁴ Bioquímica e ⁵ Medicina Interna, ⁶ Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. ⁷ Disciplina de Neurologia Clínica, UNIFESP - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo. ⁸ Departamento de Medicina Integrada, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. ⁹ Hospital Graffrée e Guinle, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. ¹⁰ Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. ¹¹ Laboratório de Identificação Genética, Centro de Pesquisa Experimental, ¹² Serviço de Genética Médica e ¹³ Rede Neurogenética, Centro de Pesquisa Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, ¹⁴ Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INAGEMP).

Key words: Huntington disease, intergenerational instability, CAG expansion

Corresponding author: Prof. Laura Bannach Jardim, Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre 90.035-903, Brazil.

Abstract

Background: Huntington's disease (HD) is due dominant expansions of a repetitive CAG segment (CAGexp) at *HTT*. CAGexp instabilities during meiosis might impact the frequency of this disorder. **Aims:** to describe the HD minimal prevalence and the intergenerational instability of the CAGexp in Brazil. **Methods:** Between 2013 and 2016, symptomatic and at risk subjects from families with a molecular diagnosis were invited to participate. Clinical and molecular data, and a complete family history were obtained. Differences between the CAGexp length of parent and child (delta-CAGexp) were calculated. The effect of age of parent on transmission instability was also inferred by correlating the delta CAGexp between siblings to their age differences. **Results:** 179 Brazilian families were ascertained. The best covered state was Rio Grande do Sul, where minimal prevalence was 1.85:100,000 inhabitants. Clinical and molecular data were extracted from 253 Brazilian carriers (213 symptomatic). Intermediate and reduced-penetrance alleles were found in 21/384 normal (5.5%) and 4/253 expanded (1.6%) chromosomes. In 32 direct transmissions, most to asymptomatic children, median instability was zero but was larger among paternal than maternal transmissions ($p=0.005$, M-W). In direct transmissions and in 51 pairs of siblings studied, parental age at the time of child birth were not correlated with delta-CAGexp. **Conclusions:** HD prevalence in South Brazil was lower than those found in European populations. CAGexp transmissions were very unstable; further expansions in paternal and contractions in maternal transmissions were not associated to parental age.

1. INTRODUCTION

Huntington disease (HD) is an adult-onset, autosomal dominant neurodegenerative disorder characterized by chorea and other motor impairments, behavioral disturbances, and dementia. HD carriers are usually severely handicapped after some years of disease onset (1). HD is caused by an expanded CAG tract of 36 or more repeats (CAG_{exp}) at *HTT* that leads to a polyglutamine (polyQ) tract at the transcribed protein named huntingtin (2, 3). As in other polyQ diseases, an inverse correlation between the CAG_{exp} and the age at onset (AO) is observed. The expanded allele is unstable upon cellular divisions, which brings variability to phenotypical expression and penetrance (4, 5).

Instabilities of the CAG_{exp} during meiosis occur and might explain, at least in part, some clinical phenomena associated with HD: anticipation, on one hand – related to further expansions of CAG_{exp} –, and non-penetrance and lack of family history, on the other - occurrences sometimes explained by contractions in past generations (6-8). Male transmissions are more unstable, contracted less and expanded more frequently than female transmissions in the cohorts studied so far; reasons are still unknown (9, 10). Considering that our timeframe as researchers favor pairing more severe offspring with less severe parents and not the opposite, the potential effect of an observation bias cannot be completely avoided (11, 12). This bias is boosted if offspring recruitment is not balanced, including preferentially symptomatic children.

Studies on the intergenerational transmissions of the CAG_{exp} included predominantly North American and European HD families (7-9, 13-15). In contrast, the most studied HD group has a Latin American origin: the HD cohort of Maracaibo, Venezuela. Since this group probably shares a common ancestor (16), its characteristics may not be generalizable to HD individuals with other origins. In any case, controversial findings on the effect of age of the affected parent (9, 17) over CAG_{exp} transmission were obtained on Maracaibo cohort.

Knowledge about HD in all other Latin American populations and families is very scarce. For instance, prevalence rates are lacking in most regions of the continent. Therefore, our aim was to describe the minimal prevalence of HD in Brazil and to study if the intergenerational instability of the CAGexp transmitted is different than those studied elsewhere, pointing to a population stratification related to environment or genetic factors.

2. METHODS

Symptomatic HD individuals with a molecular diagnosis performed in our institution, as well as their caregivers, were contacted from September, 2013 to December, 2016. They and their relatives at 50% and at 25% risk of developing HD were invited to participate in this study. At risk relatives who were not prior tested agreed to not receive laboratory results associated to this research; those who decided to perform the pre-symptomatic testing (PST) were referred to the PST program of our institution. After consent, AO of the symptomatic individuals and age, gender, gender of the parent, and age of the parent at child birth of all participants were obtained. Complete pedigrees, with updated information about living and deceased individuals, were built. Blood samples were collected and analyzed at our institution, as previously described (18). The results of molecular testing of asymptomatic individuals were added to the database by the PI (LBJ) who did not contact directly the participants under study. Afterwards, data were made anonymous before the analyses to guarantee the confidentiality of all subjects and families.

Stability of CAGexp transmissions was inferred by the difference between the CAGexp length of parent and child. A stable transmission was defined by $\Delta\text{CAGexp} = 0$. Cases of intergenerational expansion were defined by $\Delta\text{CAGexp} \geq 1$ CAGexp, while contractions were defined by $\Delta\text{CAGexp} \leq -1$ CAGexp.

In kindreds where information of CAGexp from the transmitting parent was not available, the effect of age of the parent on transmission instability was estimated by correlating the delta CAGexp between siblings to their age differences, assuming the older sibling as carrying the reference CAGexp for a given kindred.

Similarly, anticipation was considered the difference between AO of transmitting parent and AO of the child. This delta-AO was zero when both the affect parent and child had the same AO; anticipation was defined when delta-AO was equal or greater than 1. When AO in the offspring was later than the AO of the transmitting parent, delta-AO was equal or lesser than -1.

Variables AO, delta-AO, CAGexp and delta-CAGexp were described as medians and range. Non-parametric statistics were used, as most variable did not show normal distribution, and $p = 0.05$ was chosen as the significant level. Data were computed into excel files and pedigrees were built in Progeny© software. All data were analyzed in the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v 18.

We obtained informed consent from all participants. This study was approved by the Ethics Committee (EC) from our institution (Comité de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – GPPG number 13-0182) and by EC from Hospital São Paulo (UNIFESP) and from Hospital Graffrée e Guinle (UNIRIO). This study was registered at Plataforma Brasil as CAAE 15493313.2.0000.5327.

3. RESULTS

In total, 179 Brazilian families were ascertained. From those, 99 were from Rio Grande do Sul state. Prevalence was estimated for this state, whose data obtained were broader than those obtained in other parts of the country. Families from Rio Grande do Sul included 209 symptomatic HD patients, 690 individuals at 50% risk, and 515 at 25% risk individuals, living by December, 2016. Distribution

of HD families was proportional to population dispersion in this state (**Figure 1**). Considering the most recent demographic census (2016) (19), the minimal prevalence of symptomatic HD patients and of at 50% risk individuals were 1.85 and 6:100,000 inhabitants, respectively. The remaining 80 HD families (110 individuals) were from other parts of Brazil, where minimal prevalence were not estimated.

3.1 CAG repeat alleles in Brazilian families

Molecular data were obtained from 253 carriers (213 symptomatic and 40 asymptomatic subjects), plus 66 non-carriers (controls) from Brazil. In summary, there were 253 expanded and 384 normal alleles.

Normal chromosomes showed a normal distribution, with a mean \pm SD (range) of 18 ± 3.4 (9 to 33) CAG repeats. Intermediate alleles (between 27 and 35 CAG repeats) were found in 21/384 normal chromosomes (5.5%) (**Table 1**).

Among the 253 expanded chromosomes, there were 4 (1.6%) reduced-penetrance (36 to 39 CAG repeats) and 249 (98.4%) fully penetrant alleles (with 40 or more CAG repeats) (**Table 1**). Two carriers of reduced-penetrance alleles were still asymptomatic at 45 and 39 years-old. Both were children of carriers of penetrant alleles: a 39 CAG repeats individual was child of a 42 repeats carrier, and a 37 CAG repeats carrier was a child of a 43 CAG patient. CAGexp, AO and age of the participants are shown in **Table 1**. As expected and as formerly reported [Castilhos et al 2014], AO was inversely correlated with CAGexp, with $\rho = -0.7$ ($p < 0.0001$, Spearman).

Interestingly, we identified a female carrier with a CAGexp of 40 repeats who was still asymptomatic at 77 years of age. Her five children were all asymptomatic; none of them agreed to participate in the present study. Her 69 years-old brother carried a CAGexp with 43 repeats and was symptomatic since his forties.

3.2 Instabilities upon CAGexp transmissions

Thirty-two direct transmissions (13 paternal and 19 maternal) were obtained in the overall cohort: 28/32 children were still asymptomatic. Their data are presented in **Table 2**. Median instability was zero; it was larger among paternal than maternal transmissions, and the difference remained significant when we included only asymptomatic children ($p=0.006$, Mann-Whitney).

Parental CAGexp and age at the time of child birth were not correlated with delta-CAGexp, both in general and divided by gender of the parent (**Figure 2A and B**). There was no difference of CAGexp transmissions between gender of offspring, both in general and divided by parent gender (ns, Mann-Whitney; data not shown).

Fifty-one pairs of siblings were studied: 40 (78.4%) of them showed discordant CAGexp lengths. Discordant CAGexp lengths were more common upon male (13/16 or 91.6%) than female transmissions (20/27 or 72%). First, a unidirectional effect was studied, according to the hypothesis that the older the parent, the larger would be further expansions. In paternal transmissions, most of the CAGexp of the younger sib (11 out of 16) was larger than in the oldest sib. In spite of that, delta-CAGexp and difference of age between siblings were unrelated in the overall group as well as in male and in female transmissions (ns, Spearman) (**Figure 2C**). After that, a bidirectional effect was tested – ie, the effect of aging over instability in general was tested, irrespectively of this being a further expansion or a contraction. Again, no correlation was found between delta-CAGexp and age of parent at childbirth (ns, Spearman; data not shown), even when analyzing paternal and maternal transmissions separately.

4. DISCUSSION

The minimal prevalence of HD in South Brazil was 1.85/100,000. Dispersion of normal alleles and proportions of intermediate and reduced-

penetrance alleles were similar to those found in European studies. Forty four percent of CAGexp transmissions to symptomatic and asymptomatic offspring were stable: the remainder contracted or expanded. As expected, further expansions were more common than stable or contracted transmissions when the affected genitor was the father. Neither the CAGexp nor the age of the parent at the time of progeny birth were significant modifiers of CAGexp instability during transmission, but the small number of transmissions especially from male carriers might have reduced the power of this observation.

HD due to *HTT* expansions is by far the most common diagnosis among families with HD phenotype in Brazil (18). However, population frequencies were not obtained before the present survey. HD suspicion is usually straight-forward, and our institution is the only one to perform molecular analysis of *HTT* for the public health system in South Brazil. The estimated prevalence of 1.85/100,000 inhabitants in Rio Grande do Sul is minimal, but should not be too different than the actual one. For instance, we would need to detect other 355 hypothetical patients (or 71 families, based on our ratio of 2.1 symptomatic individuals per family) to achieve a prevalence of at least 5/100,000, similar to those obtained in European populations (20). We do not believe that so many undetected cases would exist in this region. Interestingly, our minimum prevalence was more similar to that found in the Venezuelan population (except Maracaibo), 0.5/100,000 inhabitants (21), than to that obtained in European countries. Since the haplotype background from HD families from Rio Grande do Sul was quite the same as those from European families (22), we believe that most of these HD families descend from European carriers settled at our country. The low prevalence would be related to the subsequent ethnic mixture, since not only Europeans but also Amerindian and African ancestors contributed to the present population of Brazil (23).

Intermediate alleles were found in 5.5% of all normal chromosomes, while proportions obtained in European populations varied between 3 and 5.8% (6, 24). Reduced-penetrance alleles corresponded to 1.6% of all expanded alleles of this

Brazilian cohort; the rates obtained in other populations ranged from 1.6 to 7.7% (6, 25, 26). If our numbers are due to a relatively small sampling or if they reflect real frequencies of intermediate and reduced-penetrance alleles in Brazil, remains to be established.

Rates of expanded and contracted CAGexp transmissions found in our cohort were similar to those obtained in other populations (8, 9, 14, 15). Considering that we obtained most CAGexp transmissions from still asymptomatic children, there is no reason to suspect of important observational biases in our study. Moreover, although the number of asymptomatic carriers of CAGexp – some of them related to documented contractions – were small, the possibility that their offspring grows unaware of HD is real. Further recurrences of symptomatic carriers in their progeny might be interpreted as isolated cases, in future, complicating genetic counseling and preventive measures. The relatively frequent contractions that occurred in CAG transmissions (21.8%) should turn counselors aware of this phenomenon.

Expansions and contractions occurred in the maternal and paternal meiosis observed in our study, as in others (7, 9, 10). Although CAGexp instabilities in HD were more severe during spermatogenesis, 42.1% of our maternal transmissions were also unstable. Thus, mechanisms favoring the instability of the CAGexp operate in both oogenesis and spermatogenesis. Instabilities in maternal transmissions might be related to DNA repair errors related to the long interruption of oocyte meiosis, or other mechanisms (27, 28). In paternal transmissions, the multiple cellular divisions associated to spermatogenesis are usually evoked to explain the CAGexp instability. In the Maracaibo cohort, Leeflang et al [1999] showed that the range and mean allele size would increase with age, according to data obtained from sperm cells analysis of 27 HD carriers (17). In the same cohort, “a weak, non-significant effect of the age of the transmitting men on repeat-length change ($p=0.05$, Bonferroni-corrected $p=0.26$)” was detected in 83 male transmissions (9). Two other studies were not able to find any correlation between

changes in the transmitted CAGexp and age of the parent at child birth, but they did not split male from female transmissions (7, 10).

In the time interval of our study, we obtained quite a few number of parent and child pairs. Getting DNA samples from affected parents and children, both alive, is a quite difficult job in such a severe disease, especially during only a three-year period of collection. We tried to increase the sample size using the second strategy - to study the relationships between the delta-CAGexp-sibs and delta-of-age-sibs, as previously done in other polyglutamine disease (12). This indirect way to test transmission increased the number of observations to 51 pairs of sibs. Quite interestingly, most male transmissions were related to further expansions in the second sib; since most of these observations included at least one asymptomatic sib, the risk of bias might not be too large. In spite of that, the observation did not achieve significance.

Finally, the effect of parental CAGexp tract size on the CAGexp transmission instability seen in other cohorts (7, 9, 10) was not observed in our population.

In conclusion, we demonstrated that HD prevalence in Rio Grande do Sul was lower than those observed in predominantly European populations. CAGexp transmissions were very unstable both in paternal and maternal lineages; the common occurrences of further expansions in paternal and contractions in maternal transmissions were confirmed. Although the age of the affected father at child birth was not correlated with the aggravation of CAGexp instabilities, this result might be due to a type II error and deserves further investigation.

5. FUNDING

This study was supported by Fundo de Apoio à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), grant numbers 0700832/2006 and 1209-2551/13-4, and by Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), grant numbers 13-0182 and 13-0183. RMC was supported by Instituto Nacional de

Genética Médica Populacional (INAGEMP). MLSP and LBJ were supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

6. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank to all families and subjects who participated in this survey.

7. REFERENCES

1. Marder K, Zhao H, Myers RH, Cudkowicz M, Kayson E, Kieburtz K, Orme C, Paulsen J, Penney JB, Jr., Siemers E, Shoulson I. Rate of functional decline in Huntington's disease. Huntington Study Group. *Neurology* 2000;54(2):452-8.
2. Group THsDCR. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 1993;72(6):971-83.
3. Hoogeveen AT, Willemsen R, Meyer N, de Rooij KE, Roos RA, van Ommen GJ, Galjaard H. Characterization and localization of the Huntington disease gene product. *Hum Mol Genet* 1993;2(12):2069-73.
4. Duyao M, Ambrose C, Myers R, Novelletto A, Persichetti F, Frontali M, Folstein S, Ross C, Franz M, Abbott M, et al. Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat Genet* 1993;4(4):387-92.
5. Andrew SE, Goldberg YP, Kremer B, Telenius H, Theilmann J, Adam S, Starr E, Squitieri F, Lin B, Kalchman MA, et al. The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet* 1993;4(4):398-403.
6. Sequeiros J, Ramos EM, Cerqueira J, Costa MC, Sousa A, Pinto-Basto J, Alonso I. Large normal and reduced penetrance alleles in Huntington disease: instability in families and frequency at the laboratory, at the clinic and in the population. *Clin Genet* 2010;78(4):381-7.
7. Ramos EM, Cerqueira J, Lemos C, Pinto-Basto J, Alonso I, Sequeiros J. Intergenerational instability in Huntington disease: extreme repeat changes among 134 transmissions. *Mov Disord* 2012;27(4):583-5.
8. Telenius H, Kremer B, Goldberg YP, Theilmann J, Andrew SE, Zeisler J, Adam S, Greenberg C, Ives EJ, Clarke LA, et al. Somatic and gonadal mosaicism of the Huntington disease gene CAG repeat in brain and sperm. *Nat Genet* 1994;6(4):409-14.
9. Wheeler VC, Persichetti F, McNeil SM, Mysore JS, Mysore SS, MacDonald ME, Myers RH, Gusella JF, Wexler NS, Group US-VCR. Factors associated with HD CAG repeat instability in Huntington disease. *J Med Genet* 2007;44(11):695-701.

10. Aziz NA, van Belzen MJ, Coops ID, Belfroid RD, Roos RA. Parent-of-origin differences of mutant HTT CAG repeat instability in Huntington's disease. *Eur J Med Genet* 2011;54(4):e413-8.
11. Maciel P, Gaspar C, DeStefano AL, Silveira I, Coutinho P, Radvany J, Dawson DM, Sudarsky L, Guimaraes J, Loureiro JE, et al. Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet* 1995;57(1):54-61.
12. Souza GN, Kersting N, Krum-Santos AC, Santos AS, Furtado GV, Pacheco D, Goncalves TA, Saute JA, Schuler-Faccini L, Mattos EP, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB. Spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease: segregation patterns and factors influencing instability of expanded CAG transmissions. *Clin Genet* 2016;90(2):134-40.
13. Kremer B, Almqvist E, Theilmann J, Spence N, Telenius H, Goldberg YP, Hayden MR. Sex-dependent mechanisms for expansions and contractions of the CAG repeat on affected Huntington disease chromosomes. *Am J Hum Genet* 1995;57(2):343-50.
14. MacDonald ME, Barnes G, Srinidhi J, Duyao MP, Ambrose CM, Myers RH, Gray J, Conneally PM, Young A, Penney J, et al. Gametic but not somatic instability of CAG repeat length in Huntington's disease. *J Med Genet* 1993;30(12):982-6.
15. Zuhlke C, Riess O, Bockel B, Lange H, Thies U. Mitotic stability and meiotic variability of the (CAG)_n repeat in the Huntington disease gene. *Hum Mol Genet* 1993;2(12):2063-7.
16. Ávila-Girón R. Medical and social aspects of Huntington's chorea in the State of Zulia, Venezuela. In: A Barbeau TC, GW Paulson, editor. *Advances in Neurology*. 1: Raven Press; 1973. p. 261-6.
17. Leeflang EP, Tavaré S, Marjoram P, Neal CO, Srinidhi J, MacFarlane H, MacDonald ME, Gusella JF, de Young M, Wexler NS, Arnheim N. Analysis of germline mutation spectra at the Huntington's disease locus supports a mitotic mutation mechanism. *Hum Mol Genet* 1999;8(2):173-83.
18. Castilhos RM, Souza AF, Furtado GV, Gheno TC, Silva AL, Vargas FR, Lima MA, Barsottini O, Pedroso JL, Godeiro C, Jr., Salarini D, Pereira ET, Lin K, Toralles MB, Saute JA, Rieder CR, Quintas M, Sequeiros J, Alonso I, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB. Huntington disease and Huntington disease-like in a case series from Brazil. *Clin Genet* 2014;86(4):373-7.
19. IBGE. <http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=rs> 2016 [
20. Rawlins MD, Wexler NS, Wexler AR, Tabrizi SJ, Douglas I, Evans SJ, Smeeth L. The Prevalence of Huntington's Disease. *Neuroepidemiology* 2016;46(2):144-53.
21. Paradisi I, Hernandez A, Arias S. Huntington disease mutation in Venezuela: age of onset, haplotype analyses and geographic aggregation. *J Hum Genet* 2008;53(2):127-35.
22. Castilhos RM, Augustin MC, Santos JA, Perandones C, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB, Rede N. Genetic aspects of Huntington's disease in Latin America. A systematic review. *Clin Genet* 2016;89(3):295-303.

23. Wang S, Ray N, Rojas W, Parra MV, Bedoya G, Gallo C, Poletti G, Mazzotti G, Hill K, Hurtado AM, Camrena B, Nicolini H, Klitz W, Barrantes R, Molina JA, Freimer NB, Bortolini MC, Salzano FM, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT, Dipierri JE, Alfaro EL, Bailliet G, Bianchi NO, Llop E, Rothhammer F, Excoffier L, Ruiz-Linares A. Geographic patterns of genome admixture in Latin American Mestizos. *PLoS Genet* 2008;4(3):e1000037.
24. Semaka A, Kay C, Doty CN, Collins JA, Tam N, Hayden MR. High frequency of intermediate alleles on Huntington disease-associated haplotypes in British Columbia's general population. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 2013;162B(8):864-71.
25. Wexler NS, Lorimer J, Porter J, Gomez F, Moskowitz C, Shackell E, Marder K, Penchaszadeh G, Roberts SA, Gayan J, Brocklebank D, Cherny SS, Cardon LR, Gray J, Dlouhy SR, Wiktorski S, Hodes ME, Conneally PM, Penney JB, Gusella J, Cha JH, Irizarry M, Rosas D, Hersch S, Hollingsworth Z, MacDonald M, Young AB, Andresen JM, Housman DE, De Young MM, Bonilla E, Stillings T, Negrette A, Snodgrass SR, Martinez-Jaurrieta MD, Ramos-Arroyo MA, Bickham J, Ramos JS, Marshall F, Shoulson I, Rey GJ, Feigin A, Arnheim N, Acevedo-Cruz A, Acosta L, Alvir J, Fischbeck K, Thompson LM, Young A, Dure L, O'Brien CJ, Paulsen J, Brickman A, Krch D, Peery S, Hogarth P, Higgins DS, Jr., Landwehrmeyer B, Project US-VCR. Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(10):3498-503.
26. Dorsey ER, Beck CA, Darwin K, Nichols P, Brocht AF, Biglan KM, Shoulson I, Huntington Study Group CI. Natural history of Huntington disease. *JAMA Neurol* 2013;70(12):1520-30.
27. Pearson CE, Nichol Edamura K, Cleary JD. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet* 2005;6(10):729-42.
28. Mirkin SM. Expandable DNA repeats and human disease. *Nature* 2007;447(7147):932-40.

7. LIST OF TABLES

Table 1. CAG repeat numbers, allele categories, age at onset and age of the study participants.

Table 2. Intergenerational transmissions of mutant *HTT* CAG repeat, divided by gender of affected parent.

8. LIST OF FIGURES

Figure 1 - Origin of HD families from Rio Grande do Sul, compared with absolute numbers of inhabitants.

Figure 2. Instabilities upon CAGexp transmissions. (A) Difference between the CAGexp length of parent and child (Delta CAGexp child-progenitor) according to progenitor age at child birth. (B) Delta CAGexp child-progenitor according to progenitor CAGexp. (C) Delta CAGexp between siblings according to their age differences, and divided by gender of affected progenitor.

Figure 1 - Origin of HD families from Rio Grande do Sul, compared with absolute numbers of inhabitants.

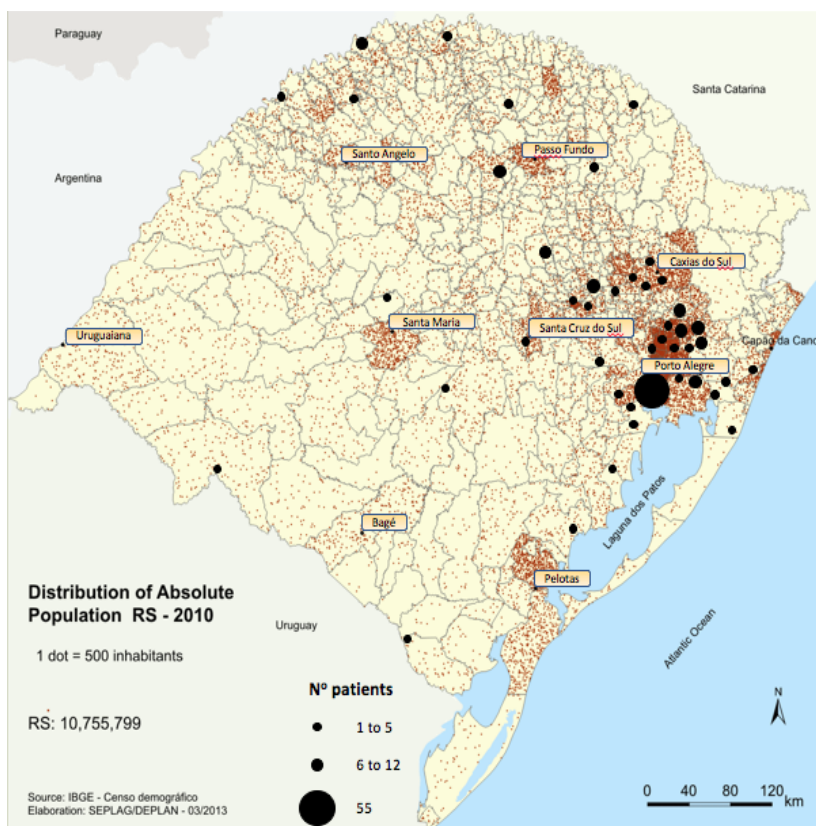
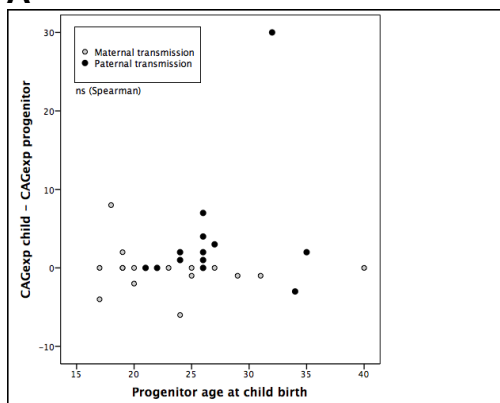
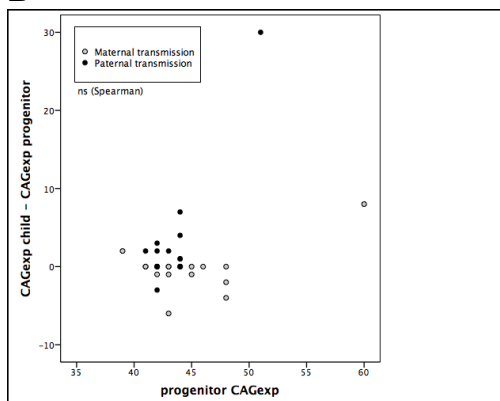


Figure 2. Instabilities upon CAGexp transmissions. (A) Difference between the CAGexp length of parent and child (Delta CAGexp child-progenitor) according to progenitor age at child birth. (B) Delta CAGexp child-progenitor according to progenitor CAGexp. (C) Delta CAGexp between siblings according to their age differences, and divided by gender of affected progenitor.

A



B



C

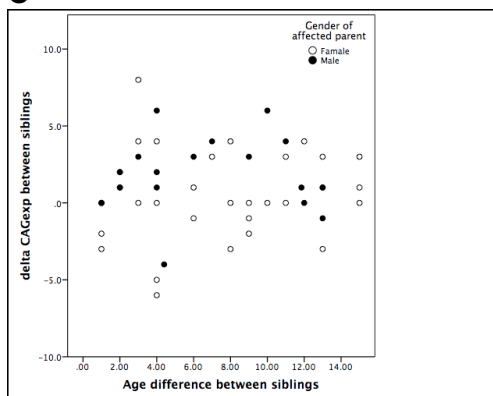


Table 1. CAG repeat numbers, allele categories, age at onset and age of the study participants

			HD carriers			Non-carriers	All
			All	Symptomatic carriers	Asymptomatic carriers		
Subjects			253	213	40	66	319
CAGexp distribution - median (range)			44 (37-81)	44 (39-81) *	43 (37-48) *	-	
Normal CAG repeat distribution - median (range)			17 (9-33)	17 (10-33)	17 (9-37)	17 (10-31)	
Number of alleles	Normal alleles	Stable (up to 27 CAG repeats)	240**	203**	37	123	363
		Intermediate (27 to 35 CAG repeats)	12	9	3	9	21
	Expanded alleles	Reduced penetrance (36 to 39 CAG repeats)	4	2	2	-	4
		full-penetrant (40 or more CAG repeats)	249	211	38	-	249
AO (years)			-	39 ± 12 (range 6-67)	-	-	
Age at the present study (years) (mean ± sd)			-	50.5 ± 11 (range 18-73) ***	35.85 ± 12 (range 19-77)	40 ± 13.75 (range 19-76)	

Table 2. Intergenerational transmissions of mutant *HTT* CAG repeat divided by gender of affected parent.

	Total	Paternal	Maternal	p
n	32	13	19	
asymptomatic children	28/32	11/13	17/19	ns (chi-squared)
delta-CAGexp Median (range)	0 (-6 to 30)	2 (-3 to 30)	0 (-6 to 8)	0.005 (Mann-Whitney)
Expanded, stable and contracted transmissions	11 (34.4%) 14 (43.75%) 7 (21.8%)	9 (69.2%) 3 (23%) 1 (7.7%)	2 (10.5%) 11(57.9%) 6 (31.6%)	0.004 (Fisher)
Parent CAGexp median (range)	43 (39-60)	43 (41-51)	44 (39-60)	ns (Mann-Whitney)
Age of affect parent at the time of child birth (mean \pm SD)	26 \pm 6	27.7 \pm 6	24.8 \pm 6	0.020 (Mann-Whitney)

Capítulo 6. Carnitine and branched chain amino acids were not good biomarkers for disease progression in Huntington's disease

Manuscrito a ser submetido.

Carnitine and branched chain amino acids were not good biomarkers for disease progression in Huntington's disease

Raphael Machado de Castilhos^{1, 12, 13}, Marina Coutinho Augustin^{6, 12}, José Augusto dos Santos^{6, 12}, José Luiz Pedroso⁸, Orlando Barsottini⁸, Roberta Saba⁸, Henrique Ballalai Ferraz⁸, Fernando Regla Vargas⁹, Gabriel Vasata Furtado^{1, 10}, Marcia Polese-Bonato^{2, 10}, Luiza Paulsen Rodrigues^{3, 10}, Lucas Schenatto Sena¹, Carmen Regla Vargas^{7, 11}, Maria Luiza Saraiva-Pereira^{1, 2, 3, 4, 10, 11, 12}, Laura Bannach Jardim^{1, 5, 6, 10, 11, 12, 13}, em nome da Rede Neurogenética.

¹ Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

² Programa de pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

³ Programa de pós-graduação em Biologia Molecular e Celular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁴ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁵ Departamento de Medicina Interna, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁶ Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁷ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁸ Disciplina de Neurologia Clínica, UNIFESP – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

⁹ Hospital Graffrée e Guinle, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

¹⁰ Laboratório de Identificação Genética, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

¹¹ Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

¹² Rede Neurogenética, Centro de Pesquisa Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

¹³ Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INAGEMP).

Key words: biomarkers; branched-chain amino acids; carnitine; Huntington disease; weight loss

Corresponding author: Prof Laura Bannach Jardim, Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre 90.035-903, Brazil. ljardim@hcpa.edu.br

Abstract

Background: Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant disease caused by the expansion of a repetitive CAG segment in the *HTT* gene. There is no disease modifying treatment so far, and biomarkers are needed for clinical trials.

Objectives: to verify whether carnitine and branched chain amino acids were altered in HD carriers, checking if they change in time and can be biomarkers of disease progression.

Methods: symptomatic individuals with molecular diagnosis of HD and their relatives at 50% risk of developing HD were recruited. Age, gender, body mass index (BMI) in all individuals and age of onset (AO) and disease duration (DD) in symptomatic individuals were obtained. CAG repeat lengths at *HTT* were obtained for all individuals. Blood samples (for valine, leucine, isoleucine and free carnitine analysis), BMI, UHDRS were obtained at baseline and at 12 months follow ups of symptomatic carriers.

Results: One hundred sixteen individuals were included: 74 symptomatic and 20 asymptomatic carriers, and 22 non-carriers. At baseline, valine levels (median, IQR) were reduced in both asymptomatic carriers (101.25, 79.6 – 123.5) and in HD patients (110, 88.4 – 131) when compared to non-carriers (123, 98.65–164.25) ($p=0.018$ and $p=0.042$). There was no difference in carnitine or isoleucine+leucine levels between groups. BMI of symptomatic individuals was lower than those of non-carriers ($p = 0.005$); however, difference between non-carriers and asymptomatic carriers was not significant. Valine levels correlated with BMI. The eight symptomatic carriers with low levels of carnitine were different from the remaining ones in their AO (32 ± 12.7 vs 42.4 ± 10.7 , $p=0.028$) and DD (12.8 ± 5.7 vs 8.4 ± 6 , $p=0.045$). Follow-up evaluation was performed in 43 symptomatic individuals (median=1.08 years). UHDRS total motor score increased by an average of 4.8 points ($p = 0.001$) and TFC decreased by an average of 0.89

points ($p < 0.0001$). No significant changes in BMI and in valine were observed. Significant increases in carnitine ($p = 0.039$, GEE) and in isoleucine+leucine levels ($p = 0.037$, GEE) were registered among symptomatic carriers in the same period.

Conclusions: although levels of valine were shown to be lower in HD carriers and were related to BMI losses observed even in pre-symptomatic individuals, neither BCAA nor carnitine were proven to be good biomarkers for HD in the setting of this study in our cohort population.

1.Introduction

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder caused by expansion of a CAG repeat sequence at *HTT* gene (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). The disease is characterized by chorea, behavioral and cognitive deterioration, and it has a progressive and inexorable course. The identification of biomarkers of HD progression is critical in the context of developing disease-modifying drugs, especially if they are sensitive and accurate enough to detect early stages of disease, particularly before the beginning of motor signs (Weir, et al., 2011; Ross, et al., 2011).

Although neurological manifestations predominate, extra-neurological impairment such as weight loss is well described (Carroll, et al., 2015; Aziz, et al., 2008). Weight loss occurs frequently in HD individuals and appears even before the onset of neurological manifestations (Djousse, et al., 2002). Energy deficiency and changes in metabolism have been proposed not only as additional manifestations but also having a potential role in the complex pathophysiological mechanisms underlying the neurological deterioration in HD (Seong, et al., 2005; Browne, et al., 2006). Considering that altered metabolism might underlie the progressive weight loss that occur early in this condition, they can also exist ahead of motor features (Lazar, et al., 2015).

Carnitine is a metabolite derived from amino acids that plays a critical role in energy production. This metabolite transports long-chain fatty acids into the mitochondria to generate energy, and toxic compounds out of this organelle to prevent their accumulation (Reuter, et al., 2012). Decline in mitochondrial function has been associated with aging as well as with HD (Turner, et al., 2010). Since carnitine concentration declines with age, reducing the integrity of the mitochondrial membrane (Noland, et al., 2009), an analog phenomenon might occur in HD (Cuturic, et al., 2013).

The branched chain amino acids (BCAAs) valine, leucine and isoleucine are essential to promote protein synthesis and turnover as well as to glucose metabolism. BCAAs participate in mitochondrial intermediary metabolism, and have physiological roles in the immune system and in brain function (Brosnan, et al., 2006). Several studies demonstrated that BCAAs plasmatic levels were low in HD patients (Perry, et al., 1969;Phillipson, et al., 1977;Underwood, et al., 2006;Mochel, et al., 2007;Mochel, et al., 2011). Therefore, both carnitine and BCAAs were proposed as candidate biomarkers of disease onset and/or progression in HD. However, longitudinal observations of these compounds in symptomatic and presymptomatic phases of disease are still missing. Our aims were to verify whether carnitine and BCAAs were altered in HD carriers. In addition, we aimed to check if those levels changed within a 12-month interval, which could be an indication of progression biomarkers for HD.

2. Methods

2.1 Population

Symptomatic individuals with molecular diagnosis of HD and their relatives at 50% risk of developing HD were invited to participate in this study. Some of those at-risk relatives had already performed pre-symptomatic testing (PST). At risk relatives who did not take PST before the invitation were blind to their molecular results obtained during the present research; those who decided to receive their results were referred to the PST programs at our institutions.

2.2 Procedures

Baseline observations occurred between June 2014 and December 2015, and included clinical observations and collection of blood specimens for metabolic analyses and molecular studies. A second observation was performed 12 months

later in symptomatic individuals only, and the same procedures were repeated, except DNA analyses.

Age, gender, body mass index (BMI) (weight in kilograms divided by height in square meters) and blood collections were obtained for all individuals at baseline, as well as age of onset (AO), disease duration (DD) since the beginning of chorea, and whole UHDRS in symptomatic subjects (Huntington Study Group, 1996). BMI, blood collections and UHDRS were repeated at 12 months follow ups of symptomatic carriers as well.

CAG repeat lengths in normal and expanded *HTT* alleles were obtained for all individuals at baseline only. Length of CAG tract was estimated as previously described (Castilhos, et al., 2014).

Blood samples were also collected in filter paper for carnitine and BCAAs analyses. Samples of at risk individuals were collected at baseline only whereas symptomatic carriers were collected at baseline and at 12-month follow-up. Carnitine and BCAAs were analyzed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC / MS / MS), using multiple reaction monitoring (MRM) (Chace, et al., 1997). Results were expressed in $\mu\text{M/L}$; levels of isoleucine and leucine were not individualized in this method and were given as a single value (isoleucine+leucine).

2.3 Statistical analysis

All researchers but the principal investigator (PI) (LBJ) were kept blind to the results of molecular testing of at risk individuals. The PI added them to the database at the end of the study duration, and turned all data anonymous. Analyses were just performed after that, to guarantee the confidentiality of all subjects and families.

Per molecular results, three groups of subjects were delineated: symptomatic carriers, asymptomatic carriers, and related controls. They were then compared in a cross sectional design. For correlation studies, all CAGexp carriers had their CAP (CAG Age product) score estimated. CAP score is an index that correlates CAG expansion with the age of the individual and tries to quantify the intensity of pathology related to HD (Penney, et al., 1997; Ross, et al., 2014).

We created a single variable (“Time to Disease”, in years) to mixed up the following information: disease duration for symptomatic individual and expected age of disease onset for those at risk, based on the formula by Langbehn et al 2010 (Langbehn, et al., 2010). For those at risk, we subtract the current age by the age of onset predicted by the formula.

Mean and standard deviation (sd) were used for variables with normal distribution, and median and interquartile range (IQR) for those without normal distribution. Nonparametric or parametric statistical tests were selected when appropriate.

A generalized estimating equation model was fitted to estimate the progression of severity scales, BMI, carnitine and BCAA in the longitudinal observation of the symptomatic groups. Time was coded as 0 (baseline) or 1 (one year of study). All analyses were carried out using the SPSS 18 statistical software package (SPSS Inc., Chicago, IL). The significance level was 0.05.

2.4 Ethics

Informed consent was obtained from all participants. This study was approved by Ethic Committee (EC) from our institution (Comité de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – GPPG number 140348) and by EC from Hospital São Paulo (UNIFESP) and from Hospital Graffée e Guinle (UNIRIO). This study was registered as CAAE 30653414.9.0000.5327.

3. Results

3.1 Cross sectional findings: differences between groups

One hundred sixteen individuals (68 females) from 69 HD families were included in the present study: 74 were symptomatic CAGexp carriers, 20 were asymptomatic carriers and 22 were non-carriers (related controls). General characteristics of this cohort are presented in **Table 1**. As expected, mean age was higher in symptomatic individuals than in those at risk: 50.3 (SD 11.2) versus 38.2 (SD 12.8) ($p < 0.0001$, anova).

At baseline, valine levels (median, IQR) were reduced in both asymptomatic carriers (101.25, 79.6 – 123.5) as well as in HD patients (110, 88.4 – 131) when compared to non-carriers (123, 98.65– 164.25) ($p=0.018$ and $p=0.042$, Mann-Whitney). There was no difference in carnitine or isoleucina+leucine levels between groups (ns, Kruskal-Wallis) (**Table 1** and **Figure 1**).

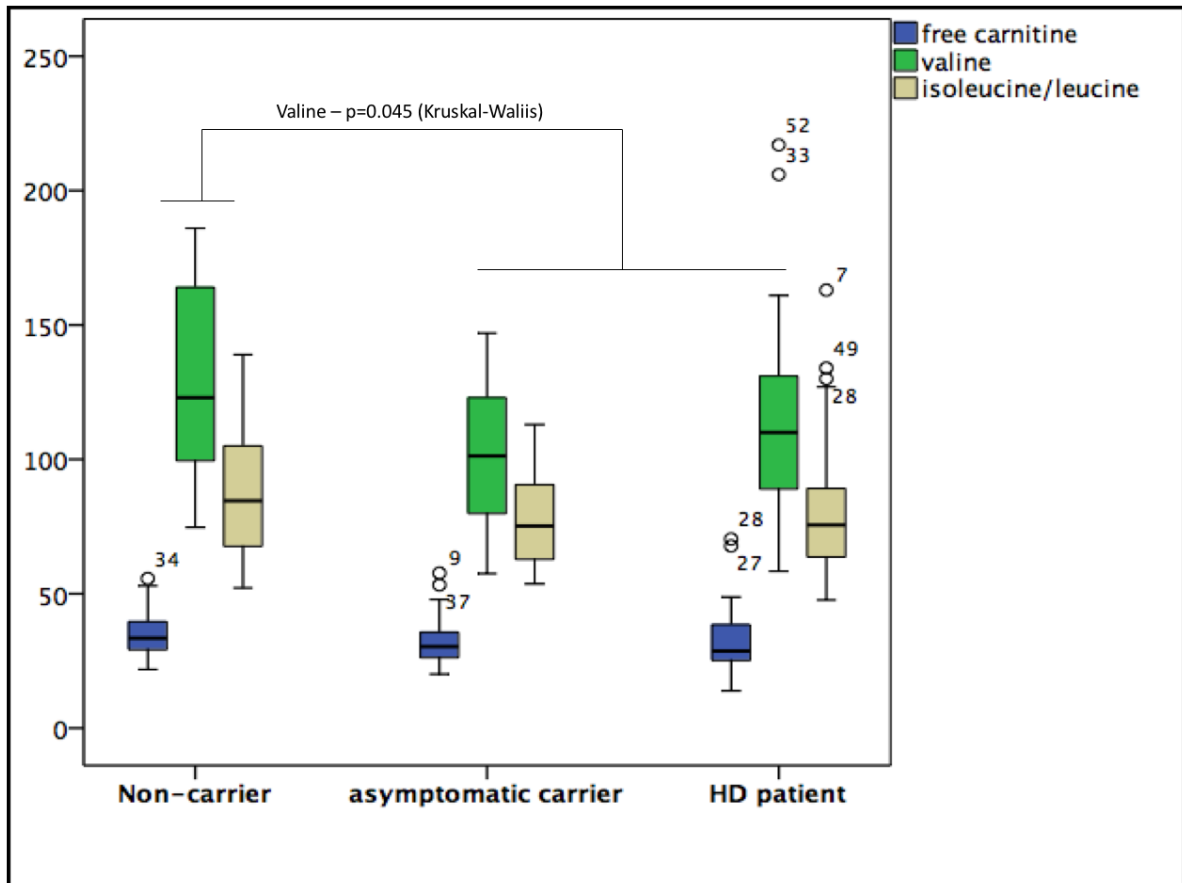
Table 1. General characteristics of groups under study – non-carriers, asymptomatic carriers and HD patients.

	All	Non-carriers	Asymptomatic carriers	HD patients	p	Normal range
N (% Female)	116 (68)	22 (15)	20 (13)	74 (37)	ns (χ^2)	-
Age (mean \pm dp)	45.9 \pm 13.1	40.8 \pm 13.7	35.3 \pm 11.3	50.3 \pm 11.2	<0.001 (Anova)	-
BMI (kg/m ²) ^a median (IQR)	23.4 (20.9- 26.4)	26.7 (22.7- 30.35)	23 (20.5- 26.2)	23.25 (20.85- 25.2)	0.006 (Mann-Whitney)	18.5 – 24.9

Free carnitine ($\mu\text{M/L}$) median (IQR)	30.9 (25.55- 37.8)	33.5 (28.7- 40.45)	30.35 (26-35.7)	28.7 (25.1- 38.6)	ns (Kruskal- Wallis)	22.2-54
BCAA valine ($\mu\text{M/L}$) median (IQR)	112.5 (89.8- 133)	123 (98.65- 164.25)	101.25 (79.6- 123.5)	110 (88.4- 131)	0.045 (Kruskal- Wallis)	48.8-141
BCAA leucine+isoleucine ($\mu\text{M/L}$) median (IQR)	76.7 (65.15- 91.9)	84.6 (67.2- 106.25)	75.2 (61- 91.2)	75.6 (63.5- 89.3)	ns (Kruskal- Wallis)	41.6-110
CAGexp median (IQR)	-	-	43 (41.25- 44.75)	44 (43- 46.25)	0.034 (Mann- Whitney)	-
CAP score (mean \pm dp)	-	-	72.2 \pm 23.3	116 \pm 18	<0.001 (T-test)	-
Time-to-disease (years) ^b median (range)	-	-	13.3 (0.6 – 40.2)			-
Age at onset (mean \pm dp)	-	-	-	41.5 \pm 11.2		-
Disease duration median (IQR)	-	-	-	8 (4- 11.25)		-

^a number of individuals who had BMI calculated: symptomatic (n=70), asymptomatic (n=19), non-carriers (n=21); ^b 1 out of 20 asymptomatic carriers had predicted age of onset smaller (41.35 years) than actual age (48 years).

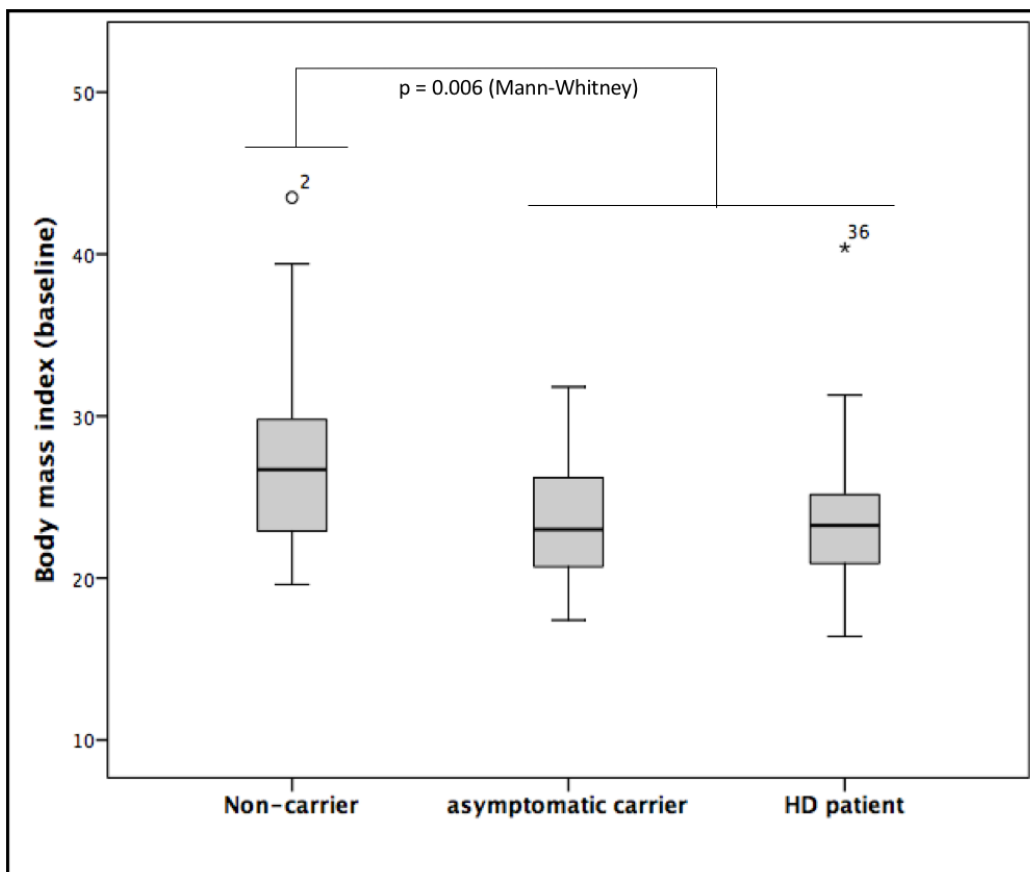
Figure 1. Levels of carnitine, valine and isoleucine+leucine in non-carriers, asymptomatic, and symptomatic carriers of CAGexp at *HTT*.



We have identified 8 HD patients with low levels of carnitine at baseline (range: 13.9 – 21.9). Their AO, DD, BMI, CAGexp, and CAP score were then compared to other symptomatic individuals. AO was lower in individuals with low free carnitine (32 ± 12.7 vs 42.4 ± 10.7), $p=0.028$, t-test. Besides, their disease duration was longer than individuals with normal free carnitine (12.8 ± 5.7 vs 8.4 ± 6), $p=0.045$, Mann-Whitney. BMI, CAGexp, CAP score, and all subscales of UHDRS were similar among groups (ns, t-test and Mann-Whitney).

BMI of symptomatic individuals was lower than those of non-carriers ($p = 0.005$, Kruskal-Wallis); however, difference between non-carriers and asymptomatic carriers did not achieve significance (ns, Kruskal-Wallis) (**Table 1** and **Figure 2**).

Figure 2. Body mass index distribution among non-carriers, asymptomatic carriers, and HD patients.



3.2 Cross sectional findings: correlations with disease burden

To clarify whether carnitine and BCAA varied per disease severity, correlations were tested against the independent variables under study: CAP score, CAGexp, Time-to/with-Disease and BMI, in all carriers; and against AO, DD and UHDRS, in symptomatic individuals (**Table 2**). Since carnitine and BCAA are candidates of

metabolic dysfunction biomarkers related to energy consumption and to weight loss, BMI correlations were also included as a standard analogy.

Table 2 – Associations between candidate markers carnitine and BCAA, and independent variables of disease severity at baseline

		Carnitine	Branched chain amino acids ($\mu\text{M/L}$)		BMI (kg/m^2)	
			Valine	Leucine+isoleucine		
All CAGexp carriers (n=94)	CAGexp	ns	ns	ns	ns	
	CAP score	ns	ns	ns	ns	
	Time-to-Disease	ns	ns	ns	ns	
	BMI (n=89)	ns	ns	0.212 *	-	
Symptomatic CAGexp carriers (n=74)	AO	ns	0,315 *	ns	ns	
	DD	ns	ns	ns	ns	
	BMI (n=70)	ns	0.306 *	0.298 *	-	
	UHDRS	Total motor score	ns	ns	ns	- 0.376 **
		Total cognition score	ns	ns	ns	0.427 **
		Functional assessment score	ns	ns	ns	0.435 **
	Independence score	ns	ns	ns	0.417 **	

		Functional capacity	ns	ns	ns	0.355 **
--	--	---------------------	----	----	----	---------------------------

* $p < 0.05$, Spearman; ** $p < 0.001$, Spearman.

Metabolites under study are expected to be physiologically related. And indeed, valine and isoleucine+leucine levels were strongly correlated ($p < 0.0001$, $\rho = 0.815$). Carnitine was correlated to isoleucine+leucine ($p = 0.025$, $\rho = 0.261$), but not to valine (ns, Spearman).

3.3 Longitudinal observations

In 43 symptomatic individuals, a follow-up evaluation was obtained after a median (IQR) interval of 1.08 year (0.96 – 1.2) (**table 3**).

Table 3. Comparison of BMI, severity scales and carnitine, valine and isoleucine+leucine between the two evaluations

	Baseline (n=74)	Follow-up (n=43)	Variation ^a
Body mass index (kg/m ²)	23.25 (20.85 to 25.2)	23.9 (20.95 – 26.45)	ns
UHDRS total motor score	53 (33.75 – 76.25)	58 (36-76)	+ 4.8
Total Functional Capacity (TFC)	5 (2-9)	5 (2-8)	- 0.89
Free carnitine (μM/L)	28.7 (25.1 – 38.6)	36.2 (28.7 – 40.2)	+ 4.15
Valine (μM/L)	110 (88.4 – 131)	109 (95-126)	ns
Isoleucine+leucine	75.6 (63.5 –	83.2 (72.3 –	+ 7.98

($\mu\text{M/L}$)	89.3)	99.2)	
---------------------	-------	-------	--

^a when the variation was significant, we express the mean variation (generalizing estimation equation).

Two scales of clinical severity, UHDRS total motor score and Total Functional Capacity (TFC), were chosen to demonstrate the progress of neurological picture within the studied interval. UHDRS total motor score increased by an average of 4.8 points ($p = 0.001$, GEE) and TFC decreased by an average of 0.89 points ($p < 0.0001$, GEE) between two evaluations.

In this time interval, no changes in BMI ($p = 0.52$, GEE) and in valine ($p = 0.43$, GEE) were observed. In contrast, significant increases in carnitine ($p = 0.039$, GEE) and in isoleucine+leucine levels ($p = 0.037$, GEE) were registered in the period (**Figure 4**).

Taken UHDRS scores and BMI as established biomarkers of disease progression, their variations (deltas) were compared to deltas of the candidate metabolites (**Table 4**).

Figure 4 Boxplot of carnitine, valine and isoleucine+leucine at baseline and follow-up.

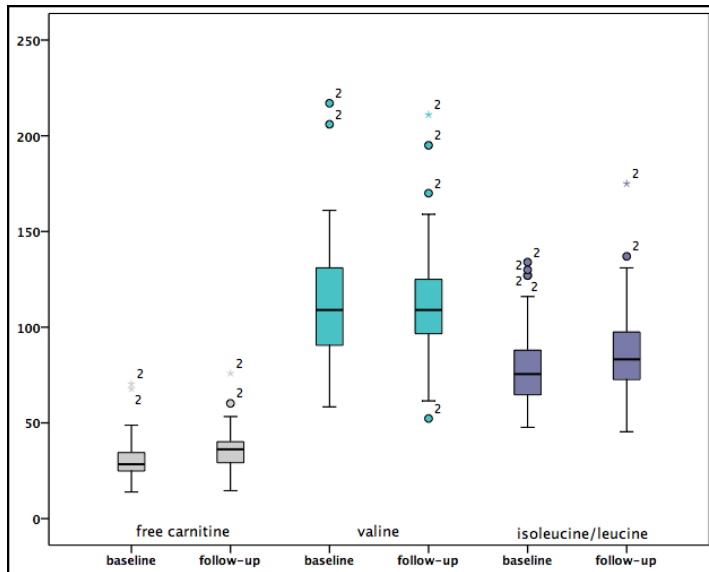


Table 4 – Variation (deltas) of established biomarkers of disease progression (BMI and UHDRS) comparing to candidate biomarkers under study, within one year interval. Spearman correlation test.

	Delta Carnitine	Deltas of BCAAs	
		Valine	Isoleucine+leucine
CAGexp	ns	ns	ns
AO	ns	ns	ns
DD	ns	ns	ns
Delta BMI	ns	ns	ns
Delta behavioral score	ns	0.338 *	ns
Delta cognitive score	ns	- 0.318 *	ns
Delta Functional	ns	ns	ns

Capacity			
Delta motor score	ns	ns	ns

* $p < 0.05$

4. Discussion

We confirmed that valine is reduced in CAGexp at *HTT* carriers, symptomatic or not, when compared to normal, related controls. In contrast, we did not find a clear association between isoleucine+leucine or carnitine with carrier or symptomatic status in HD. Valine levels were correlated to BMI and AO in symptomatic individuals. In a prospective follow up after one year, while UHDRS scores worsened significantly, neither BMI, carnitine nor BCAAs (especially valine) levels changed in symptomatic individuals. In contrast, within same interval, carnitine and isoleucine+leucine levels even increased. Therefore, the two potential candidate biomarkers valine and BMI were less sensitive to changes than UHDRS scores in our cohort, while carnitine and isoleucine+leucine seemed to be prone to placebo effects or to a real improvement in patient's care during study. Neither BCAAs, carnitine nor BMI were shown to be good candidates to describe disease progression during time interval evaluated by this study.

BCAAs have been studied in HD patients since the sixties, before the discovery of the causal gene (Perry, et al., 1969;Phillipson, et al., 1977;Watt, et al., 1978). After that, other studies evaluated amino acids in the context of a more widespread search for metabolic biomarkers of HD. Some of them found reduced levels of BCAAs in HD patients (Underwood, et al., 2006;Reilmann, et al., 1995;Gruber, et al., 2013;Cheng, et al., 2016), but not others (Mastrokolas, et al., 2016;Nambron, et al., 2016). Specifically, Mochel et al 2007 and 2011 found reduced levels of valine, isoleucine and leucine in HD symptomatic patients but not in asymptomatic

carriers (Mochel, et al., 2007;Mochel, et al., 2011). Of note, a prospective observation of BCAAs levels were not done before in this present cohort. Our baseline observations indicated that valine levels were reduced in HD carriers, independent from symptomatic status, and that they were related to AO and to BMI. In contrast, valine levels in plasma did not change significantly during our prospective observation of symptomatic subjects.

Carnitine was far less studied than BCAA in HD (Cuturic, et al., 2013;Mastrokolas, et al., 2016) (Cuturic et al 2013, Mastrokolas et al 2016). Reduced levels of carnitine were found in HD patients on advanced stages of disease (Cuturic, et al., 2013). Although this finding was not observed in in our overall cohort, we have found individuals with low levels of carnitine at later stages of the disease.

Therefore, carnitine deficiency can be a late complication of HD and should be screened for in those patients. Nonetheless, even in these severely affected individuals, carnitine levels were not related to CAGexp, CAP score, or severity scales, and no substantial changes were seen in their plasmatic levels in the follow-up evaluation.

At first, we address whether carnitine or BCAAs levels would be lower in CAG expansion carriers than in controls. Right after, our query was whether a further reduction of their levels could occur with the disease progression in the longitudinal observation of the symptomatic group. And finally, the question was related to sensitivity to changes: variation of any of these metabolites would be smaller than variation obtained with UHDRS scores or BMI. Naturally, those two latter queries were dependent upon data generated by the former one.

Valine levels showed an expected reduction in *HTT* carriers, when our first question was addressed. Therefore, valine was our best candidate as a biomarker of disease progression in HD. Despite that, we tested if all metabolic candidates changed longitudinally, in the prospective evaluation after one year. UHDRS and BMI were chosen to be the standard variables to follow disease progression.

UHDRS is a straightforward choice, being a gold-standard for HD natural history studies. BMI was chosen due to its well-established relationship to HD (Aziz, et al., 2008; Mochel, et al., 2007) and also due to the fact that it was a way to relate metabolites under study – carnitine and BCAAs – to a reasonable and acceptable pathophysiological mechanism already associated to HD.

Symptomatic individuals showed indeed progression of UHDRS total motor score and of TFC; the deterioration observed was similar to what have been observed in larger cohorts (Dorsey, et al., 2013; Meyer, et al., 2012; Tabrizi, et al., 2013). Such as previous studies, BMI was shown to be already reduced in asymptomatic carriers, suggesting that a change in metabolism occurs even before the onset of motor, cognitive, or behavioral symptoms. However, BMI did not change significantly among symptomatic individuals in the prospective observation.

We have not observed any significant change in valine levels within one year period. BMI have not shown any change in this time interval. Lack of change in valine levels after one year is in agreement with former correlation between valine and BMI at baseline. Therefore, neither BMI nor valine showed any advantage towards UHDRS in describing disease progression in this time interval.

In contrast, carnitine and isoleucine+leucine showed increased plasmatic levels in the follow up assessment. i.e., some symptomatic patients improved their metabolic profiles. Although we were unable to pick up an objective reason for that, there is no way to explain this finding other than unnoticed improvements in the general care offered to these patients.

Biomarkers are roughly divided into trait, progression and drug response biomarkers (Weir, et al., 2011). The CAGexp is the gold-standard trait biomarker for HD. So far, UHDRS is the gold-standard and the best way to describe HD progression. Despite that, UHDRS changes only 4.8 points/year and presents a high variance: per a study (Dorsey, et al., 2013), 158 individuals are needed to detect a 50% change after 3 years in a randomized clinical trial. Hence, the

discovery of sensitive biomarkers that correlate strongly with severity scales is highly important for future clinical trials. Up to date, imaging and cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers demonstrated a better performance (Tabrizi, et al., 2013;Aylward, 2014;Byrne, et al., 2016) than blood biomarkers. 8OhdG, for example, was a promising biomarker of oxidative damage, but failed when tested in a large cohort of presymptomatic and early HD patients (Borowsky, et al., 2013).

Our study had some limitations. We have performed one follow-up assessment only in symptomatic carriers. However, it is unlikely that a longer observation period could reveal that carnitine or BCAAs would in fact be good candidates for biomarkers to be used in clinical trials. In addition, our BCAA evaluation method did not allow separation of leucine from isoleucine, which could mask the effect of either of those two amino acids. Finally, a prospective evaluation of the asymptomatic carriers was not carried out, which might help to uncover unknown associations.

In conclusion, although plasmatic levels of valine were shown to be lower in HD carriers and related to BMI losses observed even in pre-symptomatic individuals, neither BCAA nor carnitine were proven to be good biomarkers for HD in the setting of this study in our cohort population.

References

1. Aylward EH. Magnetic resonance imaging striatal volumes: a biomarker for clinical trials in Huntington's disease. *Mov Disord.* 2014;29(11):1429-1433.
2. Aziz NA, van der Burg JM, Landwehrmeyer GB, et al. Weight loss in Huntington disease increases with higher CAG repeat number. *Neurology.* 2008;71(19):1506-1513.
3. Borowsky B, Warner J, Leavitt BR, et al. 8OhdG is not a biomarker for Huntington disease state or progression. *Neurology.* 2013;80(21):1934-1941.
4. Brosnan JT, Brosnan ME. Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. *J Nutr.* 2006;136(1 Suppl):207S-211S.

5. Browne SE, Beal MF. Oxidative damage in Huntington's disease pathogenesis. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(11-12):2061-2073.
6. Byrne LM, Wild EJ. Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Huntington's Disease. *J Huntingtons Dis*. 2016;5(1):1-13.
7. Carroll JB, Bates GP, Steffan J, Saft C, Tabrizi SJ. Treating the whole body in Huntington's disease. *Lancet Neurol*. 2015;14(11):1135-1142.
8. Castilhos RM, Souza AF, Furtado GV, et al. Huntington disease and Huntington disease-like in a case series from Brazil. *Clin Genet*. 2014;86(4):373-377.
9. Chace DH, Hillman SL, Van Hove JL, Naylor EW. Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem*. 1997;43(11):2106-2113.
10. Cheng ML, Chang KH, Wu YR, Chen CM. Metabolic disturbances in plasma as biomarkers for Huntington's disease. *J Nutr Biochem*. 2016;31:38-44.
11. Cuturic M, Abramson RK, Moran RR, Hardin JW, Frank EM, Sellers AA. Serum carnitine levels and levocarnitine supplementation in institutionalized Huntington's disease patients. *Neurol Sci*. 2013;34(1):93-98.
12. Djousse L, Knowlton B, Cupples LA, Marder K, Shoulson I, Myers RH. Weight loss in early stage of Huntington's disease. *Neurology*. 2002;59(9):1325-1330.
13. Dorsey ER, Beck CA, Darwin K, et al. Natural history of Huntington disease. *JAMA Neurol*. 2013;70(12):1520-1530.
14. Gruber B, Klaczko G, Jaworska M, et al. Huntington' disease—imbalance of amino acid levels in plasma of patients and mutation carriers. *Ann Agric Environ Med*. 2013;20(4):779-783.
15. Huntington Study Group. Unified Huntington's Disease Rating Scale: reliability and consistency. Huntington Study Group. *Mov Disord*. 1996;11(2):136-142.
16. Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell*. 1993;72(6):971-983.
17. Langbehn DR, Hayden MR, Paulsen JS, Group P-HiotHS. CAG-repeat length and the age of onset in Huntington disease (HD): a review and validation study of statistical approaches. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*. 2010;153B(2):397-408.
18. Lazar AS, Panin F, Goodman AO, et al. Sleep deficits but no metabolic deficits in premanifest Huntington's disease. *Ann Neurol*. 2015;78(4):630-648.
19. Mastrokolias A, Pool R, Mina E, et al. Integration of targeted metabolomics and transcriptomics identifies deregulation of phosphatidylcholine metabolism in Huntington's disease peripheral blood samples.

- Metabolomics*. 2016;12:137.
20. Meyer C, Landwehrmeyer B, Schwenke C, et al. Rate of change in early Huntington's disease: a clinicometric analysis. *Mov Disord*. 2012;27(1):118-124.
 21. Mochel F, Charles P, Seguin F, et al. Early energy deficit in Huntington disease: identification of a plasma biomarker traceable during disease progression. *PloS One*. 2007;2(7):e647.
 22. Mochel F, Benaich S, Rabier D, Durr A. Validation of plasma branched chain amino acids as biomarkers in Huntington disease. *Arch Neurol*. 2011;68(2):265-267.
 23. Nambron R, Silajdzic E, Kalliolia E, et al. A Metabolic Study of Huntington's Disease. *PloS One*. 2016;11(1):e0146480.
 24. Noland RC, Koves TR, Seiler SE, et al. Carnitine insufficiency caused by aging and overnutrition compromises mitochondrial performance and metabolic control. *J Biol Chem*. 2009;284(34):22840-22852.
 25. Penney JB, Jr., Vonsattel JP, MacDonald ME, Gusella JF, Myers RH. CAG repeat number governs the development rate of pathology in Huntington's disease. *Ann Neurol*. 1997;41(5):689-692.
 26. Perry TL, Diamond S, Hansen S, Stedman D. Plasma-aminoacid levels in Huntington's chorea. *Lancet*. 1969;1(7599):806-808.
 27. Phillipson OT, Bird ED. Plasma glucose, non-esterified fatty acids and amino acids in Huntington's chorea. *Clin Sci Mol Med*. 1977;52(3):311-318.
 28. Reilmann R, Rolf LH, Lange HW. Decreased plasma alanine and isoleucine in Huntington's disease. *Acta Neurol Scand*. 1995;91(3):222-224.
 29. Reuter SE, Evans AM. Carnitine and acylcarnitines: pharmacokinetic, pharmacological and clinical aspects. *Clin Pharmacokinet*. 2012;51(9):553-572.
 30. Ross CA, Tabrizi SJ. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol*. 2011;10(1):83-98.
 31. Ross CA, Aylward EH, Wild EJ, et al. Huntington disease: natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. *Nature reviews Neurology*. 2014;10(4):204-216.
 32. Seong IS, Ivanova E, Lee JM, et al. HD CAG repeat implicates a dominant property of huntingtin in mitochondrial energy metabolism. *Hum Mol Genet*. 2005;14(19):2871-2880.
 33. Tabrizi SJ, Scahill RI, Owen G, et al. Predictors of phenotypic progression and disease onset in premanifest and early-stage Huntington's disease in the TRACK-HD study: analysis of 36-month observational data. *Lancet Neurol*. 2013;12(7):637-649.
 34. Turner C, Schapira AH. Mitochondrial matters of the brain: the role in Huntington's disease. *J Bioenerg Biomembr*. 2010;42(3):193-198.
 35. Underwood BR, Broadhurst D, Dunn WB, et al. Huntington disease patients and transgenic mice have similar pro-catabolic serum metabolite profiles. *Brain*. 2006;129(Pt 4):877-886.
 36. Watt JA, Cunningham WL. Plasma amino acid levels in Huntington's

- chorea. *Br J Psychiatry*. 1978;132:394-397.
37. Weir DW, Sturrock A, Leavitt BR. Development of biomarkers for Huntington's disease. *Lancet Neurol*. 2011;10(6):573-590.

Capítulo 7. Discussão

Meu interesse na doença de Huntington é antigo e está ligado aos motivos que me levaram à neurologia. A presente tese partiu de uma tomada de posição geral sobre a HD na AL – e em especial, no Brasil -, para assim definir o que se poderia aportar de construtivo sobre o tema. Nossa revisão sistemática apresentada no **capítulo 3** desta tese confirmou a inexistência de estudos de base populacional em nosso continente e a escassez de investigações sobre origens ancestrais, aspectos de genética formal e peculiaridades clínicas que pudessem caracterizar a HD na nossa população. Por isso, partimos de um estudo que retratasse a dimensão provável da HD (*HTT*) entre as demais causas genéticas desse fenótipo, no Brasil, e que constituiu nosso **capítulo 4**. Para tanto, contei com o material inestimável levantado através da Rede Neurogenética e que recrutou famílias e doentes de centros urbanos um pouco mais representativos do nosso país. Com a identificação molecular dos 104 casos-índices iniciais (Castilhos, et al., 2014), eu pude recrutar muitos deles e seus parentes para as duas observações longitudinais que planejei realizar. A primeira foi a observação das transmissões do alelo mutante, CAGexp. Meu propósito foi verificar se havia alguma característica associada ao nosso background latino-americano que pudesse afetar a instabilidade da CAGexp. Os resultados dessa observação longitudinal entre as relações da CAGexp de um genitor versus as CAGexp de seus descendentes e versus os anos que os separam foram apresentados no **capítulo 5**. A segunda observação longitudinal focou nos aspectos clínicos dos portadores e constituiu-se em um estudo de coorte mais convencional. Sabíamos que a HN da HD medida através de escalas clínicas já estava bastante estabelecida na literatura. Por isso, acrescentei às nossas observações clínicas, tomadas como *gold-standard*, a análise longitudinal de candidatos a biomarcadores bioquímicos AACRs e carnitina livre. Esse feito só foi possível pela

existência de plataformas tecnológicas já existentes no SGM HCPA. Os resultados desta coorte foram apresentados no **capítulo 6**.

Passarei a comentar meus resultados originais, descritos nos capítulos 4, 5 e 6.

Avaliamos os pacientes com fenótipo de doença de Huntington (coreia e demência progressivas) provenientes de sete centros brasileiros, através da Rede Neurogenética, e tentamos determinar a frequência de diagnósticos. Verificamos que a HD por *HTT* é a causa mais frequente desse fenótipo no Brasil: 89.4% dos pacientes que se apresentaram com suspeita de HD eram portadores de CAGexp no *HTT*. Encontramos também 4 pacientes (3,8%) com Huntington's disease-like tipo 2, uma expansão CTG no gene que codifica a junctofilina-3 (HDL-2) e 1 paciente (1%) com o diagnóstico de ataxia espinocerebelar tipo-2 (SCA2) (Castilhos, et al., 2014). Dos 11 pacientes em nossa amostra que não apresentavam o diagnóstico de doença de Huntington, 36.4% apresentavam diagnóstico de HDL-2. Nossos achados são semelhantes aos dois estudos já existentes na América Latina, nos quais a frequência de HDL-2 é elevada em pacientes que não possuem CAGexp no *HTT*. Rodrigues et al avaliaram 29 pacientes com fenótipo Huntington's disease-like que não apresentavam doença de Huntington e encontraram 3 pacientes (10.3%) com o diagnóstico de HDL-2 (Rodrigues, et al., 2011). Paradisi et al 2013, na Venezuela, avaliaram 16 pacientes com fenótipo de doença de Huntington e sem CAGexp no *HTT* e encontraram 4 pacientes (25%) com o diagnóstico de HDL-2 (Paradisi, et al., 2013). Nosso achado, ao lado dessas duas séries de casos, nos permite concluir que provavelmente o diagnóstico de HDL-2 é a segunda causa mais frequente do fenótipo Huntington's disease-like em nosso continente. Esse achado não surpreende, já que as populações latino-americanas têm forte ancestralidade africana, e a maior parte dos indivíduos com HDL-2 descritos até o momento tem essa ancestralidade, mesmo que não óbvia (Margolis, 2012).

A revisão sistemática (capítulo 3) havia demonstrado que somente duas estimativas de prevalências mínimas da HD haviam sido publicadas até o momento sobre centros urbanos latino-americanos, ambas provenientes de séries de casos de hospitais terciários. Paradisi et al 2008 verificaram uma prevalência mínima baixa na Venezuela, de 0,5/100.000. Cabe ressaltar que nesse estudo foi excluído o isolado geográfico de Maracaibo e que os autores admitem um provável subestimativa do valor real da prevalência pela dificuldade em recrutar pacientes de algumas regiões (Paradisi, et al., 2008). Alonso et al 2009 avaliaram os pacientes mexicanos avaliados no centro dos autores durante um período longo de tempo e calcularam a prevalência mínima na cidade do México em 4/100.000 (Alonso, et al., 2009). Esses valores provenientes de países latino-americanos são próximos da prevalência mínima que nosso estudo calculou para o estado do Rio Grande do Sul, 1,85/100.000, dado apresentado no **capítulo 5**. Apesar desse valor não ser proveniente de um estudo de base populacional, não achamos que o valor real seja muito mais elevado, já que nosso hospital recebe a maior dos pacientes com suspeita de doença de Huntington do estado; além disso, é improvável que pacientes de nosso estado sejam encaminhados para outros estados (Santa Catarina ou Paraná) ou outros países (Uruguai ou Argentina). A estimativa da prevalência mínima em nossa população é bem inferior ao tradicionalmente descrito em estudos de base populacional em países de origem europeia (Europa e América do Norte), onde a prevalência é estimada em 5-10/100.000 (Rawlins, et al., 2016). Apesar de nossas famílias HD apresentarem provavelmente uma origem europeia, a julgar pelo perfil haplotípico semelhante de nossas famílias HD a famílias HD europeias (Castilhos, et al., 2016), a prevalência mínima baixa em nosso meio pode estar relacionada à composição étnica de nossa população, já que tanto ancestrais europeus como ameríndios e africanos contribuíram para a formação atual de nossa população (Wang, et al., 2008). Estudos de base populacional (ou mesmo de prevalência mínima) em outras regiões do país e da América Latina são fundamentais para entendermos a prevalência da HD em nossas populações.

A HD tem uma dimensão individual, que é tardia e predominantemente neurológica, e a dimensão da genética formal, que envolve a manutenção do segmento CAG expandido no pool populacional. Enquanto a fisiopatologia da primeira se dá no cenário do neurônio, os mecanismos celulares da segunda podem envolver múltiplos tecidos e fases celulares precoces na vida do sujeito, que eventualmente resultem em vantagens seletivas, como segregação diferencial dos alelos na meiose, sobrevivida maior do heterozigoto em fases precoces do desenvolvimento intra e extra-uterinos e fertilidade aumentada.

Estudos sobre a dimensão populacional têm partido de poucos grupos multinacionais. Esses estudos focaram na investigação dos haplótipos ancestrais para explicar a manutenção da HD entre europeus (Warby, et al., 2011; Lee, et al., 2012). Em nossa revisão sistemática sobre as características genéticas da HD na AL, observamos que o estudo das transmissões intergeracionais do CAGexp em famílias brasileiras até o momento foi realizado de forma muito escassa (Castilhos, et al., 2016). Estudos com número de transmissões muito reduzidos haviam sido publicados - 10 (Raskin, et al., 2000) e 4 transmissões (Agostinho, et al., 2013). Por isso, decidimos caracterizar melhor as transmissões da CAGexp entre brasileiros, em nosso estudo apresentado no **capítulo 5**. Conseguimos colecionar 32 transmissões (19 maternas e 13 paternas) - um número maior que as observações anteriores, mas ainda pequeno e com pouco poder. A observação intergeracional das transmissões depende do recrutamento de pais e de filhos afetados. Para uma condição tão incapacitante como a HD, o recrutamento simultâneo de pais e filhos afetados é muito difícil: os pais tendem a falecer antes da afecção dos filhos; a obtenção simultânea de amostras de pais e filhos pode na verdade provocar vieses. A coleção de um número maior de transmissões necessitará de muitos mais anos de acompanhamento das famílias HD. Mesmo assim, nosso estudo concluiu que o perfil de transmissões intergeracionais em famílias brasileiras é semelhante ao encontrado em outras séries de casos, como a tendência de instabilidade e expansões em transmissões paternas (Kremer, et al., 1995; Wheeler, et al., 2007); além disso, em nossa amostra a idade do

progenitor no momento da concepção não pareceu determinar a probabilidade de instabilidade/expansão do segmento CAGexp na prole, achado semelhante a outros estudos (Wheeler, et al., 2007;Aziz, et al., 2011). Em nossa análise das transmissões CAGexp utilizamos uma abordagem alternativa em virtude da dificuldade de encontrar famílias com análise do CAG do progenitor e da prole. Correlacionamos a diferença no CAGexp das irmandades com a diferença de idade entre os irmãos, com a hipótese de que filhos mais novos teriam maior chance de apresentarem maiores instabilidades ou expansões subsequentes da CAGexp. Mesmo com essa análise alternativa (51 pares de irmãos), não conseguimos confirmar um efeito da idade do progenitor (especialmente o pai) na probabilidade de expansão CAGexp na prole. Essa hipótese é interessante, já que entre os mecanismos que favorecem a instabilidade do segmento repetitivo CAGexp estão o número de divisões celulares pelas quais o mesmo passa (e a espermatogênese é particularmente associada a um grande número de divisões celulares) e os erros no reparo do DNA, ambos mais prováveis de ocorrer em indivíduos mais velhos (Pearson, et al., 2005).

A história natural da HD já estava bem definida em populações europeias e norte-americanas, onde vários consórcios internacionais descreveram com clareza esse aspecto. Em nossa coorte de indivíduos HD sintomáticos, descritos no **capítulo 6**, conseguimos verificar a progressão das subescalas UHDRS no intervalo de 1 ano e nossos achados foram similares aos encontrados por coortes maiores (Marder, et al., 2000;Dorsey, et al., 2013). Na subescala motora houve aumento em média 4,8 pontos e a escala de incapacidade TFC (Total Functional Capacity) reduziu em média 0,89 pontos.

Por fim, avaliamos quatro substâncias envolvidas no metabolismo energético (carnitina livre, valina, leucina e isoleucina) como potenciais biomarcadores de progressão na doença de Huntington no **capítulo final** dos resultados. Essas substâncias foram escolhidas em função de achados prévios (especialmente os aminoácidos de cadeia ramificada) que descreveram sua redução em pacientes portadores da expansão CAGexp e baseado nas

evidências de que o metabolismo energético está envolvido na fisiopatologia da doença (Browne, 2008; Ross, et al., 2011). Além disso, o laboratório de nossa instituição tem facilidade e experiência na dosagem dessas substâncias. Ao contrário dos estudos prévios que avaliaram essas substâncias de forma transversal, nosso estudo avaliou indivíduos sintomáticos HD de forma prospectiva. Nossos resultados mostraram que essas quatro substâncias não têm um comportamento compatível com biomarcadores de progressão da doença, ou seja, não houve correlação com as escalas de gravidades (subescalas da UHDRS); além disso, durante o período de avaliação, os níveis de carnitina livre, valina, leucina e isoleucina mantiveram-se estáveis ou aumentaram. Nossa hipótese inicial era de que houvesse redução progressiva dos níveis séricos dessas substâncias no período de observação. Não realizamos avaliação prospectiva em portadores assintomáticos HD. Entretanto, baseado no fato de que não houve diferença nos níveis das quatro substâncias entre os portadores sintomáticos e assintomáticos no baseline e que em geral os portadores assintomáticos estão há anos de iniciar os primeiros sintomas da doença, seria improvável que no período de observação de um ano alguma alteração nos níveis dos pré-sintomáticos estivesse presente. Por isso, cremos não ter perdido informação substancial com a ausência de observações longitudinais desses sujeitos.

Os resultados de nosso estudo forneceram informações adicionais ao conhecimento da doença de Huntington em geral, e em nosso país e continente em particular. Em grandes traços, podemos concluir que: 1) há uma escassez de estudos sobre a doença na América Latina; 2) os diagnósticos mais prevalentes em nosso meio do fenótipo doença de Huntington são a HD e HDL-2; 3) a prevalência mínima da HD em nosso estado, Rio Grande do Sul, parece ser menor do que em populações europeias e norte-americanas; 4) o perfil das transmissões CAGexp foi semelhante ao encontrado em séries de casos maiores e de outros continentes; 5) os AACRs e carnitina livre não são bons biomarcadores de progressão da HD.

Durante a realização do doutorado tive a oportunidade de ingressar como médico contratado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e, dessa forma, tendo o potencial apoio institucional dado pelas plataformas de diagnóstico e de pesquisa locais, tenho planos de continuar a estudar a doença de Huntington, especialmente os aspectos relacionados à perda de peso que os pacientes e os portadores assintomáticos apresentam. Além disso, como participo do ambulatório de demências, penso em caracterizar melhor as famílias com suposta causa genética de demência (especialmente caracterizadas como apresentando provável doença de Alzheimer).

Bibliografia

1. Adachi Y, Nakashima K. [Population genetic study of Huntington's disease--prevalence and founder's effect in the San-in area, western Japan]. *Nihon Rinsho*. 1999;57(4):900-904.
2. Agostinho LA, Dos Santos SR, Alvarenga RM, Paiva CL. A systematic review of the intergenerational aspects and the diverse genetic profiles of Huntington's disease. *Genetics and molecular research : GMR*. 2013;12(2):1974-1981.
3. Alonso ME, Ochoa A, Boll MC, et al. Clinical and genetic characteristics of Mexican Huntington's disease patients. *Mov Disord*. 2009;24(13):2012-2015.
4. Andre R, Scahill RI, Haider S, Tabrizi SJ. Biomarker development for Huntington's disease. *Drug Discov Today*. 2014;19(7):972-979.
5. Andrew SE, Goldberg YP, Kremer B, et al. Huntington disease without CAG expansion: phenocopies or errors in assignment? *Am J Hum Genet*. 1994;54(5):852-863.
6. Ávila-Girón R. Medical and social aspects of Huntington's chorea in the State of Zulia, Venezuela. In: A Barbeau TC, GW Paulson, ed. *Advances in Neurology*. Vol 1: Raven Press; 1973:261-266.
7. Aziz NA, van der Burg JM, Landwehrmeyer GB, et al. Weight loss in Huntington disease increases with higher CAG repeat number. *Neurology*. 2008;71(19):1506-1513.
8. Aziz NA, van Belzen MJ, Coops ID, Belfroid RD, Roos RA. Parent-of-origin differences of mutant HTT CAG repeat instability in Huntington's disease. *Eur J Med Genet*. 2011;54(4):e413-418.
9. Browne SE, Bowling AC, MacGarvey U, et al. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol*. 1997;41(5):646-653.
10. Browne SE. Mitochondria and Huntington's disease pathogenesis: insight from genetic and chemical models. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1147:358-382.
11. Castilhos RM, Souza AF, Furtado GV, et al. Huntington disease and Huntington disease-like in a case series from Brazil. *Clin Genet*. 2014;86(4):373-377.
12. Castilhos RM, Augustin MC, Santos JA, et al. Genetic aspects of Huntington's disease in Latin America. A systematic review. *Clin Genet*. 2016;89(3):295-303.
13. Chen YY, Lai CH. Nationwide population-based epidemiologic study of Huntington's Disease in Taiwan. *Neuroepidemiology*. 2010;35(4):250-254.
14. Cheng ML, Chang KH, Wu YR, Chen CM. Metabolic disturbances in plasma as biomarkers for Huntington's disease. *J Nutr Biochem*. 2016;31:38-44.

15. Costa C, Teixeira-Castro A, Constante M, et al. Exclusion of mutations in the PRNP, JPH3, TBP, ATN1, CREBBP, POU3F2 and FTL genes as a cause of disease in Portuguese patients with a Huntington-like phenotype. *J Hum Genet.* 2006;51(8):645-651.
16. Curtis AR, Fey C, Morris CM, et al. Mutation in the gene encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult-onset basal ganglia disease. *Nat Genet.* 2001;28(4):350-354.
17. Cuturic M, Abramson RK, Moran RR, Hardin JW, Frank EM, Sellers AA. Serum carnitine levels and levocarnitine supplementation in institutionalized Huntington's disease patients. *Neurol Sci.* 2013;34(1):93-98.
18. Djousse L, Knowlton B, Cupples LA, Marder K, Shoulson I, Myers RH. Weight loss in early stage of Huntington's disease. *Neurology.* 2002;59(9):1325-1330.
19. Dorsey ER, Beck CA, Darwin K, et al. Natural history of Huntington disease. *JAMA Neurol.* 2013;70(12):1520-1530.
20. Duyao M, Ambrose C, Myers R, et al. Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat Genet.* 1993;4(4):387-392.
21. Enroll-HD. Enroll -HD: A Prospective Registry Study in a Global Huntington's Disease Cohort. <https://clinicaltrials.gov/show/NCT01574053>.
22. Feigin A, Leenders KL, Moeller JR, et al. Metabolic network abnormalities in early Huntington's disease: an [(18)F]FDG PET study. *J Nucl Med.* 2001;42(11):1591-1595.
23. Geschwind DH, Perlman S, Figueroa CP, Treiman LJ, Pulst SM. The prevalence and wide clinical spectrum of the spinocerebellar ataxia type 2 trinucleotide repeat in patients with autosomal dominant cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet.* 1997;60(4):842-850.
24. Gruber B, Klaczko G, Jaworska M, et al. Huntington' disease--imbalance of amino acid levels in plasma of patients and mutation carriers. *Ann Agric Environ Med.* 2013;20(4):779-783.
25. Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature.* 1983;306(5940):234-238.
26. Hayden MR, MacGregor JM, Beighton PH. The prevalence of Huntington's chorea in South Africa. *S Afr Med J.* 1980;58(5):193-196.
27. Hensman Moss DJ, Poulter M, Beck J, et al. C9orf72 expansions are the most common genetic cause of Huntington disease phenocopies. *Neurology.* 2014;82(4):292-299.
28. Hicks SL, Robert MP, Golding CV, Tabrizi SJ, Kennard C. Oculomotor deficits indicate the progression of Huntington's disease. *Prog Brain Res.* 2008;171:555-558.
29. Hubers AA, van Duijn E, Roos RA, et al. Suicidal ideation in a European Huntington's disease population. *J Affect Disord.* 2013;151(1):248-258.
30. Huntington G. On Chorea. *The Medical and Surgical Reporter: A Weekly Journal.* 1872;26(15):317-321.
31. Huntington Study Group COHORT Investigators, Dorsey E.

- Characterization of a large group of individuals with huntington disease and their relatives enrolled in the COHORT study. *PLoS One*. 2012;7(2):e29522.
32. Huntington Study Group. Unified Huntington's Disease Rating Scale: reliability and consistency. Huntington Study Group. *Mov Disord*. 1996;11(2):136-142.
 33. Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell*. 1993;72(6):971-983.
 34. Krause A, Mitchell C, Essop F, et al. Junctophilin 3 (JPH3) expansion mutations causing Huntington disease like 2 (HDL2) are common in South African patients with African ancestry and a Huntington disease phenotype. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*. 2015;168(7):573-585.
 35. Kremer B, Goldberg P, Andrew SE, et al. A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N Engl J Med*. 1994;330(20):1401-1406.
 36. Kremer B, Almqvist E, Theilmann J, et al. Sex-dependent mechanisms for expansions and contractions of the CAG repeat on affected Huntington disease chromosomes. *Am J Hum Genet*. 1995;57(2):343-350.
 37. Kuwert T, Lange HW, Langen KJ, Herzog H, Aulich A, Feinendegen LE. Cortical and subcortical glucose consumption measured by PET in patients with Huntington's disease. *Brain*. 1990;113 (Pt 5):1405-1423.
 38. Langbehn DR, Hayden MR, Paulsen JS, Group P-HlotHS. CAG-repeat length and the age of onset in Huntington disease (HD): a review and validation study of statistical approaches. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*. 2010;153B(2):397-408.
 39. Lee JM, Gillis T, Mysore JS, et al. Common SNP-based haplotype analysis of the 4p16.3 Huntington disease gene region. *Am J Hum Genet*. 2012;90(3):434-444.
 40. Lee JM, Ramos EM, Lee JH, et al. CAG repeat expansion in Huntington disease determines age at onset in a fully dominant fashion. *Neurology*. 2012;78(10):690-695.
 41. Lipe H, Bird T. Late onset Huntington Disease: clinical and genetic characteristics of 34 cases. *J Neurol Sci*. 2009;276(1-2):159-162.
 42. Lodi R, Schapira AH, Manners D, et al. Abnormal in vivo skeletal muscle energy metabolism in Huntington's disease and dentatorubropallidoluysian atrophy. *Ann Neurol*. 2000;48(1):72-76.
 43. Mahant N, McCusker EA, Byth K, Graham S, Huntington Study G. Huntington's disease: clinical correlates of disability and progression. *Neurology*. 2003;61(8):1085-1092.
 44. Marder K, Zhao H, Myers RH, et al. Rate of functional decline in

- Huntington's disease. Huntington Study Group. *Neurology*. 2000;54(2):452-458.
45. Margolis R. HDL-2. 2012. Accessed Apr 10th, 2017.
 46. Margolis RL, O'Hearn E, Rosenblatt A, et al. A disorder similar to Huntington's disease is associated with a novel CAG repeat expansion. *Ann Neurol*. 2001;50(6):373-380.
 47. Martinez-Horta S, Perez-Perez J, van Duijn E, et al. Neuropsychiatric symptoms are very common in premanifest and early stage Huntington's Disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2016;25:58-64.
 48. Martino D, Stamelou M, Bhatia KP. The differential diagnosis of Huntington's disease-like syndromes: 'red flags' for the clinician. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(6):650-656.
 49. Mastrokolas A, Pool R, Mina E, et al. Integration of targeted metabolomics and transcriptomics identifies deregulation of phosphatidylcholine metabolism in Huntington's disease peripheral blood samples. *Metabolomics*. 2016;12:137.
 50. Meyer C, Landwehrmeyer B, Schwenke C, et al. Rate of change in early Huntington's disease: a clinicometric analysis. *Mov Disord*. 2012;27(1):118-124.
 51. Mochel F, Charles P, Seguin F, et al. Early energy deficit in Huntington disease: identification of a plasma biomarker traceable during disease progression. *PLoS One*. 2007;2(7):e647.
 52. Mochel F, Benaich S, Rabier D, Durr A. Validation of plasma branched chain amino acids as biomarkers in Huntington disease. *Arch Neurol*. 2011;68(2):265-267.
 53. Moore RC, Xiang F, Monaghan J, et al. Huntington disease phenocopy is a familial prion disease. *Am J Hum Genet*. 2001;69(6):1385-1388.
 54. Myers RH, Madden JJ, Teague JL, Falek A. Factors related to onset age of Huntington disease. *Am J Hum Genet*. 1982;34(3):481-488.
 55. Myers RH, MacDonald ME, Koroshetz WJ, et al. De novo expansion of a (CAG)_n repeat in sporadic Huntington's disease. *Nat Genet*. 1993;5(2):168-173.
 56. Nagafuchi S, Yanagisawa H, Sato K, et al. Dentatorubral and pallidolusian atrophy expansion of an unstable CAG trinucleotide on chromosome 12p. *Nat Genet*. 1994;6(1):14-18.
 57. Nambron R, Silajdzic E, Kalliolia E, et al. A Metabolic Study of Huntington's Disease. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146480.
 58. Oepen G, Cramer H, Bernasconi R, Martin P. Huntington's disease - imbalance of free amino acids in the cerebrospinal fluid of patients and offspring at-risk. *Arch Psychiatr Nervenkr (1970)*. 1982;231(2):131-140.
 59. Okun MS, Thommi N. Americo Negrette (1924 to 2003): diagnosing Huntington disease in Venezuela. *Neurology*. 2004;63(2):340-343.
 60. Orth M, Handley OJ, Schwenke C, et al. Observing Huntington's Disease: the European Huntington's Disease Network's REGISTRY. *PLoS Curr*. 2010;2:RRN1184.

61. Paradisi I, Hernandez A, Arias S. Huntington disease mutation in Venezuela: age of onset, haplotype analyses and geographic aggregation. *J Hum Genet.* 2008;53(2):127-135.
62. Paradisi I, Ikonomu V, Arias S. Huntington disease-like 2 (HDL2) in Venezuela: frequency and ethnic origin. *J Hum Genet.* 2013;58(1):3-6.
63. Paulsen JS, Hoth KF, Nehl C, Stierman L. Critical periods of suicide risk in Huntington's disease. *Am J Psychiatry.* 2005;162(4):725-731.
64. Paulsen JS, Langbehn DR, Stout JC, et al. Detection of Huntington's disease decades before diagnosis: the Predict-HD study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008;79(8):874-880.
65. Paulsen JS, Long JD, Johnson HJ, et al. Clinical and Biomarker Changes in Premanifest Huntington Disease Show Trial Feasibility: A Decade of the PREDICT-HD Study. *Front Aging Neurosci.* 2014;6:78.
66. Pearson CE, Nichol Edamura K, Cleary JD. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet.* 2005;6(10):729-742.
67. Pedroso JL, de Freitas ME, Albuquerque MV, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB, Barsottini OG. Should spinocerebellar ataxias be included in the differential diagnosis for Huntington's diseases-like syndromes? *J Neurol Sci.* 2014;347(1-2):356-358.
68. Penney JB, Jr., Vonsattel JP, MacDonald ME, Gusella JF, Myers RH. CAG repeat number governs the development rate of pathology in Huntington's disease. *Ann Neurol.* 1997;41(5):689-692.
69. Perry TL, Diamond S, Hansen S, Stedman D. Plasma-aminoacid levels in Huntington's chorea. *Lancet.* 1969;1(7599):806-808.
70. Perry TL, Hansen S, Lesk D. [Plasma amino acid levels in children of patients with Huntington's chorea]. *Neurology.* 1972;22(1):68-70.
71. Phillipson OT, Bird ED. Plasma glucose, non-esterified fatty acids and amino acids in Huntington's chorea. *Clin Sci Mol Med.* 1977;52(3):311-318.
72. Pratley RE, Salbe AD, Ravussin E, Caviness JN. Higher sedentary energy expenditure in patients with Huntington's disease. *Ann Neurol.* 2000;47(1):64-70.
73. Pringsheim T, Wiltshire K, Day L, Dykeman J, Steeves T, Jette N. The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord.* 2012;27(9):1083-1091.
74. Rampoldi L, Dobson-Stone C, Rubio JP, et al. A conserved sorting-associated protein is mutant in chorea-acanthocytosis. *Nat Genet.* 2001;28(2):119-120.
75. Raskin S, Allan N, Teive HA, et al. Huntington disease: DNA analysis in Brazilian population. *Arq Neuropsiquiatr.* 2000;58(4):977-985.
76. Rawlins MD, Wexler NS, Wexler AR, et al. The Prevalence of Huntington's Disease. *Neuroepidemiology.* 2016;46(2):144-153.
77. Reilmann R, Rolf LH, Lange HW. Decreased plasma alanine and isoleucine in Huntington's disease. *Acta Neurol Scand.* 1995;91(3):222-224.
78. Robbins AO, Ho AK, Barker RA. Weight changes in Huntington's disease. *Eur J Neurol.* 2006;13(8):e7.

79. Rodrigues GR, Walker RH, Bader B, et al. Clinical and genetic analysis of 29 Brazilian patients with Huntington's disease-like phenotype. *Arq Neuropsiquiatr.* 2011;69(3):419-423.
80. Rosenblatt A, Brinkman RR, Liang KY, et al. Familial influence on age of onset among siblings with Huntington disease. *Am J Med Genet.* 2001;105(5):399-403.
81. Rosenblatt A, Kumar BV, Mo A, Welsh CS, Margolis RL, Ross CA. Age, CAG repeat length, and clinical progression in Huntington's disease. *Mov Disord.* 2012;27(2):272-276.
82. Ross CA, Tabrizi SJ. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol.* 2011;10(1):83-98.
83. Ross CA, Aylward EH, Wild EJ, et al. Huntington disease: natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. *Nature reviews Neurology.* 2014;10(4):204-216.
84. Saft C, Zange J, Andrich J, et al. Mitochondrial impairment in patients and asymptomatic mutation carriers of Huntington's disease. *Mov Disord.* 2005;20(6):674-679.
85. Sanberg PR, Fibiger HC, Mark RF. Body weight and dietary factors in Huntington's disease patients compared with matched controls. *Med J Aust.* 1981;1(8):407-409.
86. Schmitz-Hubsch T, Coudert M, Bauer P, et al. Spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: disease severity and nonataxia symptoms. *Neurology.* 2008;71(13):982-989.
87. Scrimgeour EM, Pfumojena JW. Huntington disease in black Zimbabwean families living near the Mozambique border. *Am J Med Genet.* 1992;44(6):762-766.
88. Shao J, Diamond MI. Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Hum Mol Genet.* 2007;16 Spec No. 2:R115-123.
89. Siesling S, Vegter-van der Vlis M, Roos RA. Juvenile Huntington disease in the Netherlands. *Pediatr Neurol.* 1997;17(1):37-43.
90. Siesling S, van Vugt JP, Zwinderman KA, Kieburz K, Roos RA. Unified Huntington's disease rating scale: a follow up. *Mov Disord.* 1998;13(6):915-919.
91. Squitieri F, Andrew SE, Goldberg YP, et al. DNA haplotype analysis of Huntington disease reveals clues to the origins and mechanisms of CAG expansion and reasons for geographic variations of prevalence. *Hum Mol Genet.* 1994;3(12):2103-2114.
92. Stack EC, Matson WR, Ferrante RJ. Evidence of oxidant damage in Huntington's disease: translational strategies using antioxidants. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1147:79-92.
93. Stevanin G, Fujigasaki H, Lebre AS, et al. Huntington's disease-like phenotype due to trinucleotide repeat expansions in the TBP and JPH3 genes. *Brain.* 2003;126(Pt 7):1599-1603.
94. Stine OC, Pleasant N, Franz ML, Abbott MH, Folstein SE, Ross CA. Correlation between the onset age of Huntington's disease and length of

- the trinucleotide repeat in IT-15. *Hum Mol Genet.* 1993;2(10):1547-1549.
95. Suryawan A, Hawes JW, Harris RA, Shimomura Y, Jenkins AE, Hutson SM. A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. *Am J Clin Nutr.* 1998;68(1):72-81.
 96. Tabrizi SJ, Langbehn DR, Leavitt BR, et al. Biological and clinical manifestations of Huntington's disease in the longitudinal TRACK-HD study: cross-sectional analysis of baseline data. *Lancet Neurol.* 2009;8(9):791-801.
 97. Tabrizi SJ, Reilmann R, Roos RA, et al. Potential endpoints for clinical trials in premanifest and early Huntington's disease in the TRACK-HD study: analysis of 24 month observational data. *Lancet Neurol.* 2012;11(1):42-53.
 98. Tabrizi SJ, Scahill RI, Owen G, et al. Predictors of phenotypic progression and disease onset in premanifest and early-stage Huntington's disease in the TRACK-HD study: analysis of 36-month observational data. *Lancet Neurol.* 2013;12(7):637-649.
 99. Tobin AJ, Signer ER. Huntington's disease: the challenge for cell biologists. *Trends Cell Biol.* 2000;10(12):531-536.
 100. Toyoshima Y, Yamada M, Onodera O, et al. SCA17 homozygote showing Huntington's disease-like phenotype. *Ann Neurol.* 2004;55(2):281-286.
 101. Trejo A, Tarrats RM, Alonso ME, Boll MC, Ochoa A, Velasquez L. Assessment of the nutrition status of patients with Huntington's disease. *Nutrition.* 2004;20(2):192-196.
 102. Underwood BR, Broadhurst D, Dunn WB, et al. Huntington disease patients and transgenic mice have similar pro-catabolic serum metabolite profiles. *Brain.* 2006;129(Pt 4):877-886.
 103. van der Burg JM, Bjorkqvist M, Brundin P. Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. *Lancet Neurol.* 2009;8(8):765-774.
 104. Walker RH, Jung HH, Dobson-Stone C, et al. Neurologic phenotypes associated with acanthocytosis. *Neurology.* 2007;68(2):92-98.
 105. Walter JH. L-Carnitine. *Arch Dis Child.* 1996;74(6):475-478.
 106. Wang S, Ray N, Rojas W, et al. Geographic patterns of genome admixture in Latin American Mestizos. *PLoS Genet.* 2008;4(3):e1000037.
 107. Warby SC, Visscher H, Collins JA, et al. HTT haplotypes contribute to differences in Huntington disease prevalence between Europe and East Asia. *Eur J Hum Genet.* 2011;19(5):561-566.
 108. Watt JA, Cunningham WL. Plasma amino acid levels in Huntington's chorea. *Br J Psychiatry.* 1978;132:394-397.
 109. Wexler NS, Lorimer J, Porter J, et al. Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(10):3498-3503.
 110. Wexler NS, Collett L, Wexler AR, et al. Incidence of adult Huntington's disease in the UK: a UK-based primary care study and a systematic review. *BMJ Open.* 2016;6(2):e009070.
 111. Wheeler VC, Persichetti F, McNeil SM, et al. Factors associated with HD CAG repeat instability in Huntington disease. *J Med Genet.*

- 2007;44(11):695-701.
112. Wild EJ, Mudanohwo EE, Sweeney MG, et al. Huntington's disease phenocopies are clinically and genetically heterogeneous. *Mov Disord.* 2008;23(5):716-720.
 113. Wu YR, Lee-Chen GJ, Lang AE, Chen CM, Lin HY, Chen ST. Dystonia as a presenting sign of spinocerebellar ataxia type 1. *Mov Disord.* 2004;19(5):586-587.
 114. Zhang S, Zeng X, Ren M, Mao X, Qiao S. Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: a review. *J Anim Sci Biotechnol.* 2017;8:10.

Apêndices

Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TCLE para os indivíduos em risco de desenvolver HD

INFORMAÇÕES AOS FAMILIARES DE INDIVÍDUOS COM O DIAGNÓSTICO DE DOENÇA DE HUNTINGTON CONVIDADOS A PARTICIPAR DO ESTUDO

Esta é uma pesquisa que tem por objetivo principal avaliar o perfil de transmissão do gene causador da doença de Huntington entre diferentes gerações dentro de cada família. Queremos estudar como a doença é transmitida de geração para geração. Esse conhecimento é essencial para que possamos compreender melhor a genética da doença e dessa forma orientar de forma mais adequada os indivíduos em risco.

Você está sendo convidado a participar dessa pesquisa por ser familiar de um indivíduo que apresenta o diagnóstico de doença de Huntington. Sua participação, caso estiver de acordo com ela, envolverá: (1) uma entrevista clínica e (2) coleta de 10 ml de sangue. Contudo, isso tudo somente será feito depois que você autorizar sua participação no estudo, entregando um documento assinado por você ou por seu representante legal. Esse documento será entregue em duas vias, para que uma cópia fique com você (ou seu representante legal) e outra com os pesquisadores. Além disso, todos os custos para a realização das consultas e exames serão de inteira responsabilidade da equipe pesquisadora. Informamos também que você poderá desistir de permanecer na pesquisa a qualquer momento.

O sangue coletado será armazenado para fins de pesquisa. Ele poderá ser utilizado para outros fins somente mediante a sua autorização por escrito, tanto no presente termo de consentimento, como em documentos futuros. Solicitaremos sua autorização para qualquer nova pesquisa para a qual pensarmos em aproveitar seu material armazenado. Por isso, ficaremos com seu telefone e endereço.

A sua amostra de sangue será identificada com um código apenas e chegará anônima (não associada ao seu nome) nos nossos laboratórios. O resultado da sua análise também não estará associado ao seu nome, o que implica que ele tampouco estará disponível para você ou para seus familiares, em qualquer tempo no futuro.

Por isso, a sua participação nesta pesquisa é completamente voluntária: você está ajudando o estudo, mas não terá nenhum benefício pessoal: você não receberá as análises laboratoriais nem a sua participação resultará em qualquer tipo de atendimento. Essa pesquisa envolve a análise do gene causador da doença de Huntington; mesmo que você possa apresentar um risco teórico de vir a desenvolver a doença, não haverá, sob nenhuma hipótese, liberação dos resultados das análises.

Os indivíduos em risco de desenvolver a doença de Huntington que quiserem saber se são portadores ou não da mutação, serão encaminhados ao ambulatório de diagnóstico preditivo do HCPA, onde então poderão passar por um aconselhamento genético extenso.

Os riscos envolvidos nessa pesquisa estão relacionados ao eventual desconforto de uma entrevista e à coleta de sangue: mal-estar passageiro, mancha roxa no local e cansaço. Seu nome será mantido em sigilo pelos pesquisadores envolvidos no estudo. Os seus dados clínicos e laboratoriais serão utilizados somente para esta pesquisa e, se aparecerem em publicações, serão de forma anônima, sem possibilidade alguma de que você possa ser identificado.

Os resultados dos exames realizados no seu material (sangue) ficarão guardados de forma anônima em bancos de dados protegidos, aos quais terão acesso somente os pesquisadores envolvidos. Nenhum resultado seu será divulgado ou liberado para terceiros.

Marque a sua resposta a cada um desses itens:

1. Você teve acesso às informações dadas pelo pesquisador que vai realizar a pesquisa? Ficou com essas informações? () Sim () Não
2. Você pôde fazer perguntas a respeito do teste? () Sim () Não

<p>3. Você entendeu que os resultados dos testes laboratoriais serão utilizados somente para pesquisa e que estarão armazenados de forma sigilosa e anônima?</p> <p>() Sim () Não</p>
<p>4. Quais médicos e estudantes conversaram com você sobre esses testes e estudos?</p> <p>.....</p> <p>.....</p>
<p>5. Você entendeu que você está livre para sair do estudo a qualquer momento sem precisar dar qualquer explicação e sem que isso afete o seu atendimento médico aqui?</p> <p>() Sim () Não</p>
<p>6. Você concorda em participar desse estudo?</p> <p>() Sim, e autorizo o contato com meus descendentes listados abaixo:</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>() Não</p>
<p>7. Você quer receber o resultado da sua investigação?</p> <p>() Sim () Não</p>
<p>8. Você concorda que a sua amostra seja armazenada na nossa instituição?</p> <p>() Sim () Não</p>

Assinatura:..... Data:...../...../.....

Nome por extenso (paciente ou responsável legal):

.....

Endereço:

Telefone:

Médico (Assinatura):.....

Data:...../...../.....

Pesquisador Responsável: Dra. Laura Bannach Jardim

Pesquisador Executor: Raphael Machado de Castilhos

Endereço e telefone da pesquisadora responsável, Laura Bannach Jardim

Serviço de Genética Médica do HCPA

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil

Tel.: (51) 3359-8011

Endereço e telefone do Comitê de Ética em Pesquisa

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil

2o andar, sala 2227

Fone/Fax: 51 3359-7640

TCLE para os indivíduos HD sintomáticos

INFORMAÇÕES AOS INDIVÍDUOS COM O DIAGNÓSTICO DE DOENÇA DE HUNTINGTON

Esta é uma pesquisa que tem por objetivo principal avaliar o perfil de transmissão do gene causador da doença de Huntington entre diferentes gerações dentro de cada família. Queremos estudar como a doença é transmitida de geração para geração. Esse conhecimento é essencial para que possamos compreender melhor a genética da doença e dessa forma orientar de forma mais adequada os indivíduos em risco.

Você está sendo convidado a participar dessa pesquisa por ter o diagnóstico de doença de Huntington. Sua participação, caso estiver de acordo com ela, envolverá: (1) uma entrevista clínica, (2) a realização de exame físico detalhado e padronizado, (3) coleta de 10 ml de sangue. Contudo, isso tudo somente será feito depois que você autorizar sua participação no estudo, entregando um documento assinado por você ou por seu representante legal. Esse documento será entregue em duas vias, para que uma cópia fique com você (ou seu representante legal) e outra com os pesquisadores. Além disso, todos os custos para a realização das consultas e exames serão de inteira responsabilidade da equipe pesquisadora. Informamos também que você poderá desistir de permanecer na pesquisa a qualquer momento e sem nenhum prejuízo para seu atendimento médico nesta instituição.

O sangue coletado será armazenado para fins de pesquisa. Ele poderá ser utilizado para outros fins somente mediante a sua autorização por escrito, tanto no presente termo de consentimento, como em documentos futuros. Solicitaremos sua autorização para qualquer nova pesquisa para a qual pensarmos em aproveitar seu material armazenado. Por isso, ficaremos com seu telefone e endereço.

Os riscos envolvidos nessa pesquisa estão relacionados à coleta de sangue: mal-estar passageiro, mancha roxa no local e cansaço. Você também pode apresentar desconforto ou cansaço relacionado com a realização do exame clínico e neurológico padrão. Seu nome será mantido em sigilo pelos pesquisadores envolvidos no estudo. Os seus dados clínicos e

laboratoriais serão utilizados somente para esta pesquisa e, se aparecerem em publicações, serão de forma anônima, sem possibilidade alguma de que você possa ser identificado.

Os resultados dos exames realizados no seu material (sangue) ficarão guardados em bancos de dados protegidos e de forma anônima, aos quais terão acesso somente os pesquisadores envolvidos. Nenhum resultado seu será divulgado ou liberado para terceiros.

Marque a sua resposta a cada um desses itens:

<p>1. Você teve acesso às informações dadas pelo pesquisador que vai realizar a pesquisa? Ficou com essas informações?</p> <p>() Sim () Não</p>
<p>2. Você pôde fazer perguntas a respeito do teste?</p> <p>() Sim () Não</p>
<p>3. Você entendeu que os resultados dos testes laboratoriais serão utilizados somente para pesquisa e que estarão armazenados de forma sigilosa e anônima?</p> <p>() Sim () Não</p>
<p>4. Quais médicos e estudantes conversaram com você sobre esses testes e estudos?</p> <p>.....</p> <p>.</p>
<p>5. Você entendeu que você está livre para sair do estudo a qualquer momento sem precisar dar qualquer explicação e sem que isso afete o seu atendimento médico aqui?</p> <p>() Sim () Não</p>
<p>6. Você concorda em participar desse estudo?</p> <p>() Sim, e autorizo o contato com meus descendentes listados abaixo:</p> <p>.....</p>

<p>.....</p> <p>.....</p> <p>() Não</p>
<p>7. Você quer receber o resultado da sua investigação?</p> <p>() Sim () Não</p>
<p>8. Você concorda que a sua amostra seja armazenada na nossa instituição?</p> <p>() Sim () Não</p>

Assinatura:..... Data:...../...../.....

Nome por extenso (paciente ou responsável legal):

.....

Endereço:

Telefone:

Médico (Assinatura):.....

Data:...../...../.....

Pesquisador Executor: Raphael Machado de Castilhos

Pesquisador Responsável: Dra. Laura Bannach Jardim

Endereço e telefone da pesquisadora responsável, Laura Bannach Jardim

Serviço de Genética Médica do HCPA

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil

Tel.: (51) 3359-8011

Endereço e telefone do Comitê de Ética em Pesquisa

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil

2o andar, sala 2227

Fone/Fax: 51 3359-7640



TCLE para o projeto biomarcadores (indivíduos HD sintomáticos)

INFORMAÇÕES AOS INDIVÍDUOS COM DIAGNÓSTICO DE DOENÇA DE HUNTINGTON

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa chamado “Análise da carnitina na doença de Huntington” por apresentar o diagnóstico de doença de Huntington.

Esta é uma pesquisa que tem por objetivo principal avaliar o papel da carnitina na doença de Huntington. Essa substância é muito importante para o correto funcionamento do organismo e o objetivo da pesquisa é avaliar se os seus níveis no sangue estão alterados nos indivíduos com o diagnóstico da doença de Huntington. Essa informação é importante para entendermos melhor o funcionamento da doença.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Sua participação nesta pesquisa, caso esteja de acordo com ela, envolverá duas visitas no intervalo de um ano. Em cada uma dessas visitas, realizaremos uma entrevista clínica, um exame neurológico e uma coleta de sangue.

Contudo, isso tudo somente será feito depois que você autorizar sua participação no estudo, entregando um documento assinado por você ou por seu representante legal. Esse documento será entregue em duas vias, para que uma cópia fique com você (ou seu representante legal) e outra com os pesquisadores. Além disso, todos os custos para a realização das consultas serão de inteira responsabilidade da equipe pesquisadora. Informamos também que você poderá desistir de permanecer na pesquisa a qualquer momento e sem nenhum prejuízo para seu atendimento médico nesta instituição.

BENEFÍCIOS, RISCOS E/OU DESCONFORTOS ASSOCIADOS
À PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA

A sua participação nesta pesquisa não trará benefício direto, mas poderá contribuir para o aumento do conhecimento sobre a doença de Huntington e os resultados poderão auxiliar a realização de estudos futuros.

Os riscos envolvidos nessa pesquisa estão relacionados à coleta de sangue: mal-estar passageiro, mancha roxa no local e cansaço. Você também pode apresentar desconforto ou cansaço relacionado com a realização do exame clínico e neurológico padrão.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa. Você também não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos na presente pesquisa.

CONFIDENCIALIDADE DOS DADOS E DESTINO
DE SEUS MATERIAIS BIOLÓGICOS

Seu nome será mantido em sigilo pelos pesquisadores envolvidos no estudo. Os seus dados clínicos serão utilizados somente para pesquisa e, se aparecerem em publicações, serão de forma anônima, sem possibilidade alguma de você ser identificado.

Os resultados dos exames realizados no seu material (sangue) ficarão guardados de forma anônima em bancos de dados protegidos, aos quais terão acesso somente os pesquisadores envolvidos. Nenhum resultado seu será divulgado ou liberado para terceiros.

ESCLARECIMENTOS E CONTATOS

Todas as dúvidas poderão ser esclarecidas antes e durante o curso da pesquisa, através de contato com o pesquisador responsável, cujos dados estão abaixo. Este projeto foi aprovado pelo Comitê

de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital de Clínica de Porto Alegre. O CEP é um órgão institucional, independente dos interesses dos investigadores, que avalia os aspectos éticos das pesquisas e os corrige. O CEP poderá ser contatado para esclarecimento de suas dúvidas.

Nome do participante: _____

Assinatura: _____

Nome do responsável (se aplicável): _____

Assinatura: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____

Local: _____ Data: ____/____/____

Pesquisador Executor: Raphael Machado de Castilhos

Pesquisador Responsável: Prof^a. Laura Bannach Jardim

Endereço e telefone da pesquisadora responsável, Laura Bannach Jardim

Serviço de Genética Médica do HCPA

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil

Tel.: (51) 3359-8011

Fax: (51) 3359-8010

Endereço e telefone do Comitê de Ética em Pesquisa

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil

2o andar, sala 2227

Fone/Fax: 51 3359-7640

Atendimento das 8 às 17h

TCLE para o projeto biomarcadores (indivíduos em risco de desenvolver HD)

INFORMAÇÕES AOS FAMILIARES DE INDIVÍDUOS COM DOENÇA DE HUNTINGTON

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa chamado “Análise da carnitina na doença de Huntington” por ser familiar de um indivíduo com o diagnóstico de doença de Huntington e por apresentar risco de desenvolver a doença.

Esta é uma pesquisa que tem por objetivo principal avaliar o papel da carnitina na doença de Huntington. Essa substância é muito importante para o correto funcionamento do organismo e o objetivo da pesquisa é avaliar se os seus níveis no sangue estão alterados nos indivíduos com o diagnóstico da doença de Huntington. Essa informação é importante para entendermos melhor o funcionamento da doença.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Sua participação nesta pesquisa, caso esteja de acordo com ela, envolverá duas visitas no intervalo de um ano. Em cada uma dessas visitas, realizaremos uma entrevista clínica e uma coleta de sangue, no qual o gene responsável pela doença de Huntington e a carnitina serão estudados.

Contudo, isso tudo somente será feito depois que você autorizar sua participação no estudo, entregando um documento assinado por você. Esse documento será entregue em duas vias, para que uma cópia fique com você e outra com os pesquisadores. Além disso, todos os custos para a realização das consultas serão de inteira responsabilidade da equipe pesquisadora. Informamos também que você poderá desistir de permanecer na pesquisa a qualquer momento e sem nenhum prejuízo para seu atendimento médico nesta instituição.

BENEFÍCIOS, RISCOS E/OU DESCONFORTOS ASSOCIADOS
À PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA

A sua participação nesta pesquisa não trará benefício direto, mas poderá contribuir para o aumento do conhecimento sobre a doença de Huntington e os resultados poderão auxiliar a realização de estudos futuros.

Os riscos envolvidos nessa pesquisa estão relacionados à coleta de sangue: mal-estar passageiro, mancha roxa no local e cansaço.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa. Você também não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos na presente pesquisa.

CONFIDENCIALIDADE DOS DADOS E DESTINO DE SEUS MATERIAIS BIOLÓGICOS

Seu nome será mantido em sigilo pelos pesquisadores envolvidos no estudo. Os seus dados clínicos serão utilizados somente para pesquisa e, se aparecerem em publicações, serão de forma anônima, sem possibilidade alguma de você ser identificado.

Os resultados dos exames realizados no seu material (sangue) ficarão guardados de forma anônima em bancos de dados protegidos, aos quais terão acesso somente os pesquisadores envolvidos. Nenhum resultado seu será divulgado ou liberado para terceiros. A análise molecular a ser realizada em seu sangue não estará disponível nem mesmo para você. Ela não será revelada a ninguém, sendo guardada de forma anônima.

ESCLARECIMENTOS E CONTATOS

Todas as dúvidas poderão ser esclarecidas antes e durante o curso da pesquisa, através de contato com o pesquisador responsável, cujos dados estão abaixo. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital de Clínica de Porto Alegre. O CEP é um órgão institucional, independente dos interesses dos investigadores, que avalia os aspectos éticos das pesquisas e os corrige. O CEP poderá ser contatado para esclarecimento de suas dúvidas.

Nome do participante: _____

Assinatura: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____

Local: _____ Data: ____ / ____ / ____

Pesquisador Responsável: Dra. Laura Bannach Jardim

Pesquisador Executor: Raphael Machado de Castilhos

Endereço e telefone da pesquisadora responsável, Laura Bannach Jardim

Serviço de Genética Médica do HCPA

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil

Tel.: (51) 3359-8011

Endereço e telefone do Comitê de Ética em Pesquisa

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil

2o andar, sala 2227

Fone/Fax: 51 3359-7640

Atendimento das 8 às 17h

Anexos

Unified Huntington's Disease Rating Scale (UHDRS)

Unified Huntington's Disease Rating Scale '99

Nome do indivíduo:

Data do exame:

Examinador:

Escore motor

Ocular Pursuit

- 0 - complete
- 1 - jerky
- 2 - interrupted/full range
- 3 - incomplete range
- 4 - cannot pursue

Horizontal: _____ Vertical: _____

Saccade Initiation

- 0 - normal
- 1 - increased latency
- 2 - suppressible blinks/head movements to initiate
- 3 - unsuppressible head movements
- 4 - cannot initiate

Horizontal: _____ Vertical: _____

Saccade Velocity

- 0 - normal
- 1 - mild slowing
- 2 - moderate slowing
- 3 - severely slow, full range
- 4 - incomplete range

Horizontal: _____ Vertical: _____

Dysarthria

- 0 - normal
 - 1 - unclear, no need to repeat
 - 2 - must repeat
 - 3 - mostly incomprehensible
 - 4 - mute
-

Tongue Protrusion

- 0 - normal
 - 1 - <10 seconds
 - 2 - <5 seconds
 - 3 - cannot fully protrude
 - 4 - cannot beyond lips
-

Finger Taps

- 0 - normal (15/5sec)
- 1 - mild slowing or reduction in amp.
- 2 - moderately impaired. may have occasional arrests (7- 10/15sec)
- 3 - severely impaired. Frequent hesitations and arrests
- 4 - can barely perform

Direita: _____ Esquerda: _____

Pronate / Supinate

- 0 - normal
- 1 - mild slowing/irregular
- 2 - moderate slowing and irregular
- 3 - severe slowing and irregular
- 4 - cannot perform

Direita: _____ Esquerda: _____

Fist-Hand-Palm Sequence (Luria)

- 0 - >4 in 10 seconds without cues
 - 1 - <4 in 10 sec. without cues
 - 2 - >4 in 10 sec. with cues
 - 3 - <4 in 10 sec. with cues
 - 4 - cannot perform
-

Rigidity-arms

- 0 - absent
- 1 - slight or only with activation
- 2 - mild/moderate
- 3 - severe, full range of motion
- 4 - severe with limited range

Direita: _____ Esquerda: _____

Bradykinesia

- 0 - normal
 - 1 - minimally slow
 - 2 - mildly but clearly slow
 - 3 - moderately slow
 - 4 - marked slowing, long delays in initiation
-

Maximal Dystonia

- 0 - absent
- 1 - slight/intermittent
- 2 - mild/common or moderate/intermittent
- 3 - moderate/common
- 4 - marked/prolonged

Tronco: _____

Membro superior direito: _____

Membro superior esquerdo: _____

Membro inferior direito: _____

Membro inferior esquerdo: _____

Maximal Chorea

- 0 - absent
- 1 - slight/intermittent
- 2 - mild/common or moderate/intermittent
- 3 - moderate/common
- 4 - marked/prolonged

Face: _____

Buco-oro-lingual: _____

Membro superior direito: _____

Membro superior esquerdo: _____

Membro inferior direito: _____

Membro inferior esquerdo: _____

Gait

- 0 - normal narrow base
 - 1 - wide base, and/or slow
 - 2 - wide base, walks with difficulty
 - 3 - walks with assistance
 - 4 - cannot attempt
-

Tandem Walking

- 0 - normal for 10 steps
 - 1 - 1-3 deviations
 - 2 - >3 deviations
 - 3 - cannot complete
 - 4 - cannot attempt
-

Retropulsion

- 0 - normal
 - 1 - recovers spontaneously
 - 2 - would fall if not caught
 - 3 - falls spontaneously
 - 4 - cannot stand
-

Score Total:

Score Comportamental

Depressed Mood

<p>Frequency</p> <p>“Within the past month, how often have you been feeling sad, down or “blue”?”</p> <p>0 = never or almost never</p> <p>1 = seldom, less than once a week</p> <p>2 = sometimes, at least once a week</p> <p>3 = frequently, several times a week</p> <p>4 = very frequently, most of the time</p>	<p>Severity</p> <p>“How has your mood affected your daily activities?” [Evidence of sad mood from behavioral observation includes sad voice or expression, tearfulness.]</p> <p>0 = no mood disturbances</p> <p>1 = questionable or equivocal</p> <p>2 = mild, responds to redirection and reassurance</p> <p>3 = moderately depressed, expresses distress</p> <p>4 = severe, significant suffering and loss of functioning</p>
---	---

Apathy

<p>Frequency</p> <p>“Within the past month, how often have you found that you have lost interest in things that used to be important to you? For example, are you just as interested as always in trying new things, starting new projects, or do you sit around a lot doing</p>	<p>Severity</p> <p>“How has apathy impacted your ability to carry out daily activities?”</p> <p>0 = no evidence</p> <p>1 = equivocal</p> <p>2 = mild apathy – subject not initiating conversation or activity but is responsive</p> <p>3 = moderate apathy – sometimes</p>
--	--

<p>nothing?" [Apathy is a lack of interest or emotional involvement in things. Apathy is reflected behaviorally by neglecting hygiene, being inactive, doing little unless told to by someone else, failing to initiate conversation.]</p> <p>0 = never</p> <p>1 = seldom apathetic, less than once a week</p> <p>2 = sometimes, at least once a week</p> <p>3 = frequently, several times a week</p> <p>4 = very frequently, most all the time</p>	<p>responds to efforts to get involved in conversation/activities</p> <p>4 = severe apathy – generally unresponsive to attempts to involve subject in activities or conversation</p>
---	--

Low self-esteem / Guilt

<p>Frequency</p> <p>“Within the past month, how often have you been feeling badly about yourself?” For example, thinking or saying that you are a failure or blaming yourself for things.</p> <p>0 = never or almost never</p> <p>1 = seldom, less than once a week</p> <p>2 = sometimes, at least once a week</p> <p>3 = frequently, several times a week</p> <p>4 = very frequently, most all the time</p>	<p>Severity</p> <p>“How have these feelings affected your daily activities?”</p> <p>0 = no evidence</p> <p>1 = questionable or equivocal</p> <p>2 = mild, responds to reassurance</p> <p>3 = moderate, impacts on everyday life</p> <p>4 = severe, causing a restriction of activities</p>
--	--

Suicidal thoughts

<p>Frequency</p> <p>“Within the past month, how often have you thought about hurting yourself or</p>	<p>Severity</p> <p>“Do you have a plan in mind to end it all? Have you taken any steps toward carrying out your plan?”</p> <p>0 = no suicidal thoughts</p>
--	--

<p>ending it all?”</p> <p>0 = not thinking about suicide or self-harm</p> <p>1 = seldom thinking about suicide-less than once a month</p> <p>2 = sometimes thinking about suicide-at least once a month</p> <p>3 = frequently thinking about suicide-at least once a week</p> <p>4 = often thinks about suicide-sometimes for days and weeks on end</p>	<p>1 = no thoughts at current time, but person talks about suicide as a potential option</p> <p>2 = seriously considered suicide but has no plan</p> <p>3 = has a plan, but no active preparations</p> <p>4 = has a plan and is actively preparing</p>
---	--

Anxiety

<p>Frequency</p> <p>“Within the past month, how often have you found yourself worrying about things?” [Evidence of anxiety includes worrying, panic, or feeling fearful].</p> <p>0 = never or almost never</p> <p>1 = seldom, less than once a week</p> <p>2 = sometimes, at least once a week</p> <p>3 = frequently, several times a week</p> <p>4 = very frequently, most all the time</p>	<p>Severity</p> <p>“How much has nervousness or worry affected your daily activities?”</p> <p>0 = no evidence</p> <p>1 = questionable or equivocal</p> <p>2 = mild, responds to reassurance</p> <p>3 = moderate, impacts on everyday life</p> <p>4 = severe, causing a profound restriction of activities</p>
--	---

Irritable Behavior

<p>Frequency</p> <p>“In the past month, how often have you felt impatient, irritable, or “cranky”?”</p> <p>0 = never or almost never</p>	<p>Severity</p> <p>“How has irritability impacted your ability to get along with others?”</p> <p>0 = behavior well controlled</p>
--	---

1 = seldom, less than once a week	1 = questionable or equivocal
2 = sometimes, at least once a week	2 = definite but mild
3 = frequently, several times a week	3 = moderate, others change their behavior to avoid irritating subject
4 = very frequently, most all the time	4 = severe irritability

Disruptive or Aggressive behavior

<p>Frequency</p> <p>“Within the past month, how often have you had emotional or temper outbursts? How often have you had times when you lost control of yourself?”</p> <p>0 = never or almost never</p> <p>1 = seldom, less than once a month</p> <p>2 = sometimes, at least once a month</p> <p>3 = frequently, at least once a week</p> <p>4 = very frequently, everyday</p>	<p>Severity</p> <p>“Have you used threats or hostile words? Have you hit or shoved or thrown things or expressed your temper in a physical way?”</p> <p>0 = behavior well controlled</p> <p>1 = verbal threats or intimidating behavior</p> <p>2 = mild physically or verbally threatening behavior</p> <p>3 = clear physical threat (moderately aggressive), bumping, shoving, verbal outburst</p> <p>4 = clear physical threat, (severe aggression) striking/hitting, or definite intention to cause injury</p>
--	---

Perseverative / Obsessional Thinking

<p>Frequency</p> <p>“Within the past month, how often have you found yourself getting stuck on certain ideas? How often have you been bothered by thoughts, images, or fears that keep coming back even if you try not to have them?”</p>	<p>Severity</p> <p>“How do repeated thoughts impact your daily life?”</p> <p>0 = thinking is always flexible</p> <p>1 = questionable or equivocal</p> <p>2 = gets stuck on certain ideas but can be</p>
---	---

0 = never or almost never	easily redirected
1 = seldom, less than once a week	3 = moderate-gets stuck on certain ideas, difficult to redirect
2 = sometimes, at least once a week	4 = severe-gets stuck on certain ideas, and does not respond to redirection
3 = frequently, several times a week	
4 = very frequently, most all the time	

Compulsive Behavior

<p>Frequency</p> <p>“Within the past month, how often have you found yourself doing certain things over and over again (counting, washing, checking)?”</p> <p>0 = never or almost never</p> <p>1 = seldom, less than once a week</p> <p>2 = sometimes, at least once a week</p> <p>3 = frequently, several times a week</p> <p>4 = very frequently, most all the time</p>	<p>Severity</p> <p>“Are you unable to resist doing some of these things?”</p> <p>0 = behavior is always well controlled</p> <p>1 = equivocal-has mild impulse not sufficient act on</p> <p>2 = mild-has impulse, acts on impulse, but can stop</p> <p>3 = moderate-has impulse, acts on it and sometimes cannot stop</p> <p>4 = severe-has impulse, acts on it and cannot stop</p>
---	--

Delusions

<p>Frequency</p> <p>“How often does it seem like people are out to get you, people are controlling you, or you are very suspicious of others? Do you have special powers or importance?”</p> <p>0= no evidence</p>	<p>Severity</p> <p>“When you feel suspicious (insert delusion here), are you able to convince yourself that it is not rational?” [Severity should reflect the behavior’s impact on the individual’s ability to carry out daily activities as indicated by response choices.]</p>
--	--

<p>1= seldom, less than once a month</p> <p>2= sometimes, at least once a month</p> <p>3= frequently, at least once a week</p> <p>4 = very frequently, sometimes for days on end</p>	<p>0 = no evidence</p> <p>1 = has delusional idea(s), not sure it is true</p> <p>2 = convinced of idea(s) but allows that the idea is not true</p> <p>3 = utterly convinced of the idea(s), but not acting on them</p> <p>4 = utterly convinced of the idea(s), behavior is determined by the delusion(s)</p>
--	---

Hallucinations

<p>Frequency</p> <p>“How often have you heard things that other people couldn’t hear, or seen things that other people couldn’t see?”</p> <p>0 = no evidence of hallucinations</p> <p>1 = seldom, less than once a month</p> <p>2 = sometimes, at least once a month</p> <p>3 = frequently, at least once a week</p> <p>4 = often, sometimes for days on end</p>	<p>Severity</p> <p>“When you see or hear things (insert hallucination here), are you able to convince yourself that it is not rational?” [Severity should reflect the behavior’s impact on the individual’s ability to carry out daily activities as indicated by response choices.]</p> <p>0 = no evidence</p> <p>1 = has hallucinations, but not sure that they are real</p> <p>2 = convinced of the reality of the hallucinations but allows that it is possible that they are not real, and not acting on them</p> <p>3 = utterly convinced of the hallucinations being real, but not acting on them</p> <p>4 = severe-has hallucinations that are vivid, subject is utterly convinced they are real and the hallucinations impact behavior</p>
--	---

Escores funcionais

Functional Assessment

Yes or No
Could subject engage in gainful employment in his/her accustomed work?
Could subject engage in any kind of gainful employment?
Could subject engage in any kind of volunteer or non-gainful work?
Could subject manage his/her finances (monthly) without any help?
Could subject shop for groceries without help?
Could subject handle money as a purchaser in a simple cash (store) transaction?
Could subject supervise children without help?
Could subject operate an automobile safely and independently?
Could subject do his/her own housework without help?
Could subject do his/her own laundry (wash/dry) without help?
Could subject prepare his/her own meals without help?
Could subject use the telephone without help?
Could subject take his/her own medications without help?
Could subject feed himself/herself without help?
Could subject dress himself/herself without help?
Could subject bathe himself/herself without help?
Could subject use public transportation to get places without help?
Could subject walk to places in his/her neighborhood without help?
Could subject walk without falling?
Could subject walk without help?

Could subject comb hair without help?
Could subject transfer between chairs without help?
Could subject get in and out of bed without help?
Could subject use toilet/commode without help?
Could subject's care still be provided at home?

Independence Scale

Please indicate the most accurate current level of subject's independence	
100	No special care needed avoided
090	No physical care needed if difficult tasks are avoided.
080	Pre-disease level of employment changes or ends; cannot perform household chores to pre-disease level, may need help with finances
070	Self-care maintained for bathing, limited house-hold duties (cooking and use of knives), driving terminates; unable to manage finances
060	Needs minor assistance in dressing, toileting, bathing; food must be cut for patient
050	24-hour supervision appropriate; assistance required for bathing; eating, toileting
040	Chronic care facility needed; limited self-feeding, liquified diet
030	Patient provides minimal assistance in own feeding, bathing, toileting
020	No speech, must be fed
010	Tube fed, total bed care

Functional Capacity

OCCUPATION

- 0 = unable
- 1 = marginal work only
- 2 = reduced capacity for usual job
- 3 = normal

FINANCES

- 0 = unable
- 1 = major assistance
- 2 = slight assistance
- 3 = normal

DOMESTIC CHORES

- 0 = unable
- 1 = impaired
- 2 = normal

ADL

- 0 = total care
- 1 = gross tasks only
- 2 = minimal impairment
- 3 = normal

CARE LEVEL

- 0 = full time skilled nursing
- 1 = home or chronic care
- 2 = home

TOTAL: _____

Escalas cognitivas

Teste de Stroop

Estímulo (nomes de cores)



Estímulo para leitura de palavras

VERMELHO	VERDE	AZUL	VERDE	VERMELHO	AZUL	AZUL	VERDE	VERMELHO	VERDE
VERMELHO	AZUL	VERDE	VERMELHO	AZUL	VERMELHO	VERDE	VERDE	AZUL	AZUL
VERMELHO	AZUL	VERDE	AZUL	VERMELHO	VERDE	VERMELHO	AZUL	VERDE	VERMELHO
VERMELHO	VERDE	AZUL	VERMELHO	VERDE	VERMELHO	AZUL	VERDE	VERMELHO	VERDE
VERDE	VERMELHO	AZUL	VERDE	AZUL	VERDE	VERMELHO	AZUL	AZUL	VERMELHO
VERMELHO	VERDE	AZUL	VERDE	VERMELHO	VERDE	AZUL	VERMELHO	AZUL	VERDE
AZUL	VERDE	AZUL	VERMELHO	AZUL	VERMELHO	VERDE	AZUL	VERMELHO	VERDE
VERDE	VERMELHO	AZUL	VERMELHO	VERDE	AZUL	VERMELHO	VERMELHO	VERDE	AZUL
AZUL	VERMELHO	AZUL	VERDE	VERMELHO	AZUL	VERDE	VERMELHO	AZUL	VERMELHO
VERDE	AZUL	VERDE	AZUL	VERMELHO	VERDE	VERMELHO	AZUL	VERDE	VERMELHO
AZUL	VERMELHO	AZUL	VERDE	VERMELHO	AZUL	VERDE	VERMELHO	AZUL	VERMELHO

Estímulo para interferência

VERMELHO	VERDE	AZUL	VERDE	VERMELHO	AZUL	AZUL	VERDE	VERMELHO	VERDE
VERMELHO	AZUL	VERDE	VERMELHO	AZUL	VERMELHO	VERDE	VERDE	AZUL	AZUL
VERMELHO	AZUL	VERDE	AZUL	VERMELHO	VERDE	VERMELHO	AZUL	VERDE	VERMELHO
VERMELHO	VERDE	AZUL	VERMELHO	VERDE	VERMELHO	AZUL	VERDE	VERMELHO	VERDE
VERDE	VERMELHO	AZUL	VERDE	AZUL	VERDE	VERMELHO	AZUL	AZUL	VERMELHO
VERMELHO	VERDE	AZUL	VERDE	VERMELHO	VERDE	AZUL	VERMELHO	AZUL	VERDE
AZUL	VERDE	AZUL	VERMELHO	AZUL	VERMELHO	VERDE	AZUL	VERMELHO	VERDE
VERDE	VERMELHO	AZUL	VERMELHO	VERDE	AZUL	VERMELHO	VERMELHO	VERDE	AZUL
AZUL	VERMELHO	AZUL	VERDE	VERMELHO	AZUL	VERDE	VERMELHO	AZUL	VERMELHO
VERDE	AZUL	VERDE	AZUL	VERMELHO	VERDE	VERMELHO	AZUL	VERDE	VERMELHO
AZUL	VERMELHO	AZUL	VERDE	VERMELHO	AZUL	VERDE	VERMELHO	AZUL	VERMELHO

Teste de Associação de Símbolos e Dígitos

SÍMBOLOS

(÷	┌	Γ	┐	>	+)	÷
1	2	3	4	5	6	7	8	9

(┐	÷	(┌	>	÷	Γ	(>	÷	(>	(÷

Γ	>	(÷	┐	>	┌	Γ	(÷	>	÷	Γ	┌)

Γ	┐	+)	(┌	+	Γ)	┐	÷	÷	┌	Γ	+

÷	Γ	┐	(>	Γ	(┐	>	+	÷)	┌	>	Γ

÷	┐)	┌	>	+	Γ	┐	÷	┌	+	÷	÷)	(

>	÷	+	÷	┌	>	Γ	÷	(+	÷	┐	>)	Γ

÷)	+	÷	┌	+)	┐	(÷	÷	(Γ	┌	>

┐	÷	(>	Γ	÷	(>	÷	+	┌	┐	Γ)	÷

Fluência Verbal fonológica (FAS)

Letra	0-15 segundos	16-30 segundos	31-45 segundos	46-60 segundos
F				
Total de acertos	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

A				
Total de acertos	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Letra	0-15 segundos	16-30 segundos	31-45 segundos	46-60 segundos
S				
Total de acertos	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>