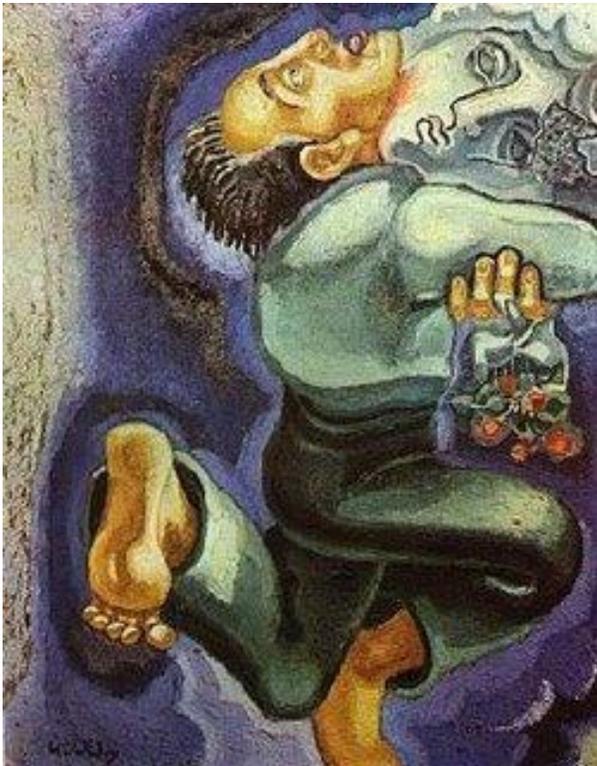




UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Doença de Huntington Onde estamos agora?



Cristina Januário  
2011





UNIVERSIDADE DE COIMBRA

# Doença de Huntington Onde estamos agora?

## Orientadores

Luís Augusto Salgueiro Cunha

Professor Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Catarina Isabel Neno Resende de Oliveira

Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Figura da Capa | “A Fuga” óleo sobre tela de Mário Eloy, Lisboa, 1939  
(autorização da família)  
Relatório de análise Estatística | Keypoint: José Francisco Loff  
Composição Gráfica | Alda Gonçalves

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de Coimbra para prestação de  
Provas de Doutoramento em Medicina.

## **As primeiras palavras**

Este é, apenas, o desenlace natural de uma carreira.

Representa o trabalho desenvolvido numa área a que dediquei parte da minha vida profissional, e à qual vou continuar a dedicar-me – tanto ainda para fazer.

Ao longo da vida fui acumulando dívidas, muitas dívidas que contraí e que não sei se conseguirei saldar. A maior delas foi com os meus amigos Luís Cunha e Catarina Oliveira. Não sei se a pago, mas pelo menos espero que a “obra” lhes agrade e fique como uma prova do meu enorme apreço e gratidão.

Sofro de procrastinação, mal que me acompanha desde que me conheço. Sempre gostei de deixar para amanhã o que posso fazer hoje. Não por indolência, mas porque protelar se ajusta melhor ao meu tempo psicológico. Tenho, por isso, uma enorme dívida para com todos os que fizeram com que o amanhã acabasse hoje, aqui. Obrigada a todos os que me acompanham e eu acompanho, amigos, colegas.

Obrigada também, e sobretudo, a todos aqueles que vivem do lado mais sombrio da vida - os que vivem com a doença.



# RESUMO

A doença de Huntington (DH) é a mais comum das doenças neurodegenerativas autossómicas dominantes com início na idade adulta. Clinicamente caracteriza-se por alterações motoras, psiquiátricas e deterioração cognitiva progressiva, sintomas estes que se associam a atrofia selectiva do estriado e do córtex cerebral. A doença inicia-se de forma insidiosa, habitualmente entre os trinta e os quarenta anos, podendo no entanto manifestar-se durante o primeiro ano de vida, ou tardiamente, acima dos oitenta anos. É causada por uma mutação no terminal 5' do gene da huntingtina, que consiste numa expansão instável do tripleto CAG (citosina-adenina-guanina) responsável pela codificação da glutamina. A huntingtina mutada apresenta alterações na sua conformação originando a formação de agregados proteicos intra-celulares e intra-nucleares, e no processo de clivagem que sofre sob a acção de proteases produz substâncias intermediárias, protofibrilhas e oligómeros, potencialmente tóxicas. Os complexos mecanismos que levam à degenerescência e morte neuronal não estão ainda completamente elucidados e, como tal, não existe até ao momento qualquer tratamento curativo ou que modifique o curso inexorável da doença. No entanto foi já demonstrado que a huntingtina mutada induz anomalias no DNA e enzimas mitocondriais, com conseqüente alteração nos processos metabólicos e de *stress* oxidativo celular. Deste modo, a disfunção mitocondrial e os *deficits* metabólicos e energéticos resultantes têm um importante papel no processo de neurodegenerescência da DH.

Assim, é objectivo do presente estudo

1. Caracterizar uma população de doentes com Doença de Huntington seguidos na Consulta de Doenças Neurogenéticas dos HUC (aproximadamente cem famílias com diagnóstico confirmado por estudo molecular). Os dados demográficos, clínicos e laboratoriais desta população foram registados numa base de dados criada para esse efeito. Foi feita também a observação, avaliação e registo dos familiares em risco, utilizando o mesmo protocolo.

2. Identificar factores que influenciem a idade de início dos primeiros sintomas.

A partir dos registos existentes foi objectivo do estudo recolher informação sobre a história natural da doença. Foi feita a avaliação do estadio motor, cognitivo e comportamental, quer dos portadores da mutação assintomáticos, quer dos doentes, utilizando as escalas padronizadas para esse efeito e

utilizadas por rotina na consulta. Pretendemos, assim, determinar os sinais mais precoces de doença e identificar os testes de maior sensibilidade para esse efeito. Pretende-se, também, encontrar marcadores que possam influenciar ou determinar a variabilidade no início sintomático. A avaliação dos portadores assintomáticos foi realizada de forma sistematizada, duas vezes por ano.

3. Identificar as características fenotípicas das formas juvenis e tardias de doença.

O tamanho da expansão CAG é responsável por 42 a 73% da variância na idade de início; no entanto, outros factores genéticos e ambientais serão responsáveis pelo pleomorfismo encontrado nesta e em outras características da doença. Pretende-se identificar as formas juvenis e tardias e a sua relação com eventuais modificadores genéticos que determinem o início sintomático nesta patologia.

4. Reconhecer alterações neuropsicológicas que possam ser marcadores de doença.

Dentro da avaliação neuropsicológica global identificar e caracterizar as alterações comportamentais mais frequentes e precoces na da DH, que podem preceder os sinais motores. O reconhecimento de *déficits* comportamentais e psiquiátricos em fases precoces da doença pode contribuir para o melhor entendimento da anatomo-fisiologia dos circuitos envolvidos, nomeadamente as vias de ligação entre o córtex e os gânglios da base. Pretende-se contribuir para a identificação das funções não motoras destas estruturas.

5. Avaliar a Qualidade de Vida em doentes com Doença de Huntington.

Procurar objectivar com os instrumentos existentes a percepção que o doente tem do seu estado de saúde, e o impacto que a doença crónica exerce sobre si. Identificar qual a componente da doença (motora, cognitiva ou comportamental) que exerce maior impacto na qualidade de vida do doente, com o propósito de encontrar a melhor intervenção terapêutica que a possa modificar.

6. Contribuir para a identificação de alguns dos mecanismos moleculares implicados no processo de morte neuronal, nomeadamente alterações na função mitocondrial.

Utilizando como modelo de estudo linhas celulares humanas de híbridos (sistemas citoplasmáticos híbridos obtidos pela fusão de plaquetas dos doentes

ou dos controlos, com células humanas de teratocarcinomas sem DNA mitocondrial), pretende-se avaliar as alterações no metabolismo energético mitocondrial dos híbridos dos doentes.

**Observação:**

***Nos últimos dois anos, parte do material que consta nesta dissertação foi objecto de publicação, integrando os artigos científicos aqui referenciados:***

Ferreira IL, Nascimento MV, Ribeiro M, Almeida S, Cardoso SM, Grazina M, Pratas J, Santos MJ, Januário C, Oliveira CR, Rego AC. Mitochondrial-dependent apoptosis in Huntington's disease human cybrids. *Exp Neurol.* 2010 Apr;222(2):243-55.

Januário F, Júlio F, Januário C. Qualidade de vida na Doença de Huntington -que sintomas a influenciam? *Sinapse.* 2011;11(1):12-15.

Ferreira IL, Cunha-Oliveira T, Nascimento MV, Ribeiro M, Proença MT, Januário C, Oliveira CR, Rego AC. Bioenergetic dysfunction in Huntington's disease human cybrids. *Exp Neurol.* 2011 Jun 13.



# ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is the most common autosomal dominant neurodegenerative disease with onset in adulthood. Clinically characterized by motor and psychiatric abnormalities and progressive cognitive deterioration, these symptoms are associated with selective atrophy of the striatum and the cerebral cortex. The disease starts insidiously, usually between thirty and forty years, and the symptoms may occur during the first year of life, or later, after eighty years. It is caused by a mutation in the 5' end of the huntingtin gene, which is an unstable expansion of the CAG triplet (cytosine-adenine-guanine) responsible for encoding the glutamine. The mutated huntingtin shows changes in its configuration causing the formation of intra-cellular and intra-nuclear protein aggregates. The process of cleavage conducted by the action of proteases produces intermediate substances, protofibrils and oligomers, which are potentially toxic. The complex mechanisms leading to neuronal degeneration and death are not yet fully explained and, as such, there has been no curative treatment or one to modify the inexorable course of the disease to date. However, it has been shown that the mutated Huntingtin induces abnormalities in the DNA and mitochondrial enzymes, with consequent changes in the metabolic processes and the cellular oxidative *stress*. Thus, mitochondrial dysfunction and the resulting metabolic and energy *deficits* have an important role in the neurodegeneration of HD.

The aims of this study are:

1. To characterize the genotypic and phenotypic aspects of a population of patients.

The demographic, clinical and laboratory facts of this population were registered in a database created for this purpose. Family members at risk were also observed, evaluated and registered using the same protocol.

2. To identify factors that influence the age of onset of the first symptoms.

From the existing records it was the objective of the study to collect information on the natural history of disease. We assess the motor, cognitive and behavioral symptoms from either asymptomatic carriers of the mutation and from patients, using standardized scales for this purpose and used routinely in the outpatient clinic. We intend, therefore to determine the earliest signs of disease and to identify the most sensitive tests for this purpose. The aim was, also, to find markers that may influence or determine the variability at symptoms onset. The

evaluation of asymptomatic carriers was performed in a systematic manner, twice a year.

3. To identify the phenotypic characteristics of juvenile and late forms of disease.

CAG repeat length is responsible for 42-73% of the variation seen in clinical presentation; however, other genetic and environmental factors are responsible for the pleomorphism found in this and other disease characteristics. It is intended to characterize juvenile and late-onset disease forms and their possible relationship to genetic modifiers that determine the early symptoms in this pathology.

4. To recognize neuropsychological changes that may be markers of disease.

The recognition of psychiatric and behavioral deficits in the early stages of disease can contribute to a better understanding of the anatomic-physiologic circuits involved, including the pathways connecting the cortex and the basal ganglia. This is intended to contribute to the identification of non-motor functions of these structures.

5. To assess the Quality of Life in patients with Huntington's disease.

To recognize with the existing tools the perception that the patient has of his health, and the impact that chronic illness has on him. Identify which component of the disease (motor, cognitive or behavioral) exerts the greatest impact on quality of life of the patient, in order to find the best therapeutic intervention that can modify it.

6. To contribute to the identification of some of the molecular mechanisms involved in the process of neuronal death, including changes in mitochondrial function.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO - DOENÇA DE HUNTINGTON – <i>O ESTADO DA ARTE</i> .....	3
I.1. Um pouco de História.....	3
I.1.1. George Huntington.....	3
I.1.2. A doença antes de Huntington.....	4
I.1.3. O Lago Maracaibo.....	5
I.1.4. A investigação molecular.....	6
I.1.5. Os modelos animais.....	8
I.2. O gene.....	9
I.2.1. Ganho de função da expansão CAG.....	11
I.2.2. Alteração das propriedades físicas e funcionais da proteína mutada.....	11
I.2.3. Agregados proteicos.....	12
I.2.4. Clivagem proteica.....	13
I.2.5. Modificações pós-tradução.....	13
I.2.6. Interações com outros elementos proteicos.....	14
I.2.7. Efeitos tóxicos a nível do RNA.....	15
I.2.8. Disfunção Neuronal.....	16
I.3. A Patologia.....	17
I.4. A imagem.....	22
I.4.1. Ressonância Magnética Funcional.....	23
I.5. A doença e os doentes.....	25
I.5.1. Outros sintomas da doença.....	27
I.6. Epidemiologia.....	28
I.7. Terapêutica.....	30
CAPÍTULO II - MATERIAL E MÉTODOS.....	33
II.1. Os doentes.....	33
II.1.1. Metodologia utilizada na Avaliação Demográfica e Clínica.....	33
II.1.2. Tratamento estatístico dos dados recolhidos.....	37
II.1.2.1. Análise estatística.....	37
II.1.2.2. Análise descritiva.....	37
II.1.2.3. Análise comparativa.....	38
II.1.2.4. Análise de sobrevivência.....	38
II.1.2.5. Nível de significância.....	38
II.1.3. Valores omissos.....	38
II.1.4. Software.....	39

II.2. Metodologia utilizada na avaliação da Qualidade de Vida em doentes com Doença de Huntington.....	39
II.2.1. Análise estatística do estudo sobre Qualidade de Vida .....	39
II.3. Metodologia utilizada no estudo da disfunção bioenergética nos híbridos de doentes com Doença de Huntington.....	40
II.3.1. Materiais e Métodos.....	40
II.3.2. Produção de híbridos, cultura e incubação com 3-NP .....	40
II.3.3. Quantificação do ATP e Fosfocreatina .....	41
II.3.4. Determinação do piruvato e lactato intracelular.....	41
II.3.5. Quantificação da relação NADH/NAD mitocondrial .....	42
II.3.6. Actividade das enzimas do ciclo tricarboxílico.....	42
II.3.7. Determinação da actividade da glicose-6-fosfato desidrogenase.....	42
II.3.8. Determinação das concentrações de aspartato, glutamato, glutamina e alanina.....	42
 CAPÍTULO III – RESULTADOS .....	 43
III.1. Caracterização dos doentes .....	43
III.1.1. Dados sociodemográficos .....	43
III.1.2. População total.....	45
III.1.3. Escolaridade .....	46
III.1.4. Patologias associadas .....	47
III.2. Caracterização da Doença .....	47
III.3. Diagnóstico genético.....	49
III.3.1. Forma de Transmissão.....	52
III.4. Caracterização da população total .....	54
III.4.1. Idade do primeiro sintoma .....	54
III.4.2. Mortalidade.....	59
III.4.3. Avaliação Global dos indivíduos.....	60
III.4.4. Avaliação UHDRS - Componente motora .....	64
III.4.5. Avaliação UHDRS - Componente cognitiva.....	67
III.4.6. Avaliação UHDRS – Componente comportamental na população de doentes.....	69
III.4.7. Avaliação global.....	71
III.5. Indivíduos preditivos positivos e os indivíduos preditivos negativos .....	72
III.6. Os doentes - caracterização por estadios .....	73
III.7. Avaliação das terapêuticas utilizadas .....	74
III.8. Apresentação dos Resultados referente a variação da Qualidade de Vida na DH .....	75
III.9. Apresentação dos Resultados Laboratoriais.....	77
 CAPÍTULO IV - DISCUSSÃO .....	 83
IV.1. Avaliação global da população em estudo.....	85
IV.1.1. Alelos.....	85
IV.1.2. Educação.....	89
IV.1.3. Formas juvenis e formas tardias de doença .....	91

IV.1.4. Evolução.....	92
IV.2. Avaliação comportamental e psiquiátrica nos indivíduos doentes e pré-sintomáticos.....	95
IV.3. Discussão Terapêutica.....	100
IV.3.1. Tetrabenazina.....	100
IV.3.2. Pridopidina .....	102
IV.3.3. Memantina.....	103
IV.4. Qualidade de Vida na DH.....	105
IV.5. Disfunção mitocondrial.....	107
CAPÍTULO V - CONCLUSÕES .....	113
V.1. Epidemiologia.....	113
V.2. Diagnóstico genético.....	114
V.3. Apatia .....	114
V.4. Evolução da doença .....	115
V.5. Terapêuticas utilizadas.....	116
V.6. Qualidade de Vida.....	116
V.7. Disfunção Mitocondrial .....	117
CAPÍTULO VI – BIBLIOGRAFIA .....	119

# TABELAS

Tabela 1: Distribuição Geográfica da população do estudo.....	45
Tabela 2 : Distribuição dos doentes por classes profissionais.....	46
Tabela 3: Prevalência de outras patologias.....	47
Tabela 4 e 5: Número das repetições CAG, por tipo diagnóstico.....	51
Tabela 6: Número de repetições CAG no alelo expandido, por família.....	53
Tabela 7: Idade da primeira consulta. ....	54
Tabela 8: Idade de aparecimento do primeiro sintoma nos indivíduos doentes .....	55
Tabela 9: Correlação entre a idade de aparecimento do primeiro sintoma e o número de repetições CAG no alelo expandido nos indivíduos doentes ..	58
Tabela 10: Avaliação motora e neuropsicológica dos indivíduos doentes na 1ªConsulta .....	61
Tabela 11: Avaliação motora e neuropsicológica dos indivíduos doentes na 2ª Consulta. Intervalo de 12 meses .....	61
Tabela 12: Variações entre consultas. Intervalo de 1 ano.....	62
Tabela 13: Correlação entre a deterioração motora e a escala de independência.....	67
Tabela 14: Correlação entre a deterioração cognitiva e o número de repetições CAG .....	68
Tabela 15: Correlação entre a deterioração cognitiva e a escala de independência.....	68
Tabela 16: Correlação entre a deterioração cognitiva e a escolaridade .....	68
Tabela 17: Odds ratios relativamente à presença de apatia e depressão como preditores de diagnóstico positivo .....	73
Tabela 18: Comparação da variação nos <i>scores</i> motores ao longo de um ano, nos 7 indivíduos tratados com tetrabenazina.....	74
Tabela 19: Comparação da variação nos <i>scores</i> motores ao longo de um ano, nos 10 indivíduos tratados com pridopidina.....	74
Tabela 20: Análise descritiva das características clínicas dos doentes. Avaliados pela escala da qualidade de vida SF-36.....	75

# FIGURAS

Figura 1: Distribuição dos indivíduos por sexo .....	44
Figura 2: Estado civil da população global .....	44
Figura 3: Distribuição por tipo de diagnóstico.....	44
Figura 4: Distribuição dos indivíduos por nível de escolaridade .....	46
Figura 5: Distribuição dos indivíduos por diagnóstico.....	48
Figura 6: Distribuição dos doentes por estadio de funcionalidade, de acordo com a escala de <i>Shoulson e Fahn</i> .....	48
Figura 7: Classificação dos alelos de acordo com o número de repetições CAG em toda a população do estudo .....	49
Figura 8: Distribuição dos indivíduos doentes e preditivos positivos, de acordo com o tamanho do alelo expandido .....	49
Figura 9: Comparação do número de repetições CAG, por tipo de diagnóstico .....	50
Figura 10: Número de repetições CAG nos indivíduos preditivos negativos e preditivos positivos .....	51
Figura 11: Distribuição dos indivíduos doentes e preditivos positivos de acordo com a via de transmissão da expansão de repetições CAG .....	52
Figura 12: Número de repetições CAG de acordo com a via de transmissão.....	52
Figura 13: Distribuição do número de repetições CAG no maior alelo por família....	53
Figura 14: Frequência de apresentação das formas juvenis e tardias .....	55
Figura 15: Comparação do número de repetições CAG entre os indivíduos com forma juvenil de DH e os restantes indivíduos doentes .....	56
Figura 16: Idade de aparecimento do primeiro sintoma vs. repetições CAG no maior alelo, nos indivíduos doentes .....	57
Figura 17: Idade de aparecimento do primeiro sintoma vs repetições CAG no alelo normal, nos indivíduos doentes.....	57
Figura 18: Características do primeiro sintoma por nível de escolaridade .....	59
Figura 19: Curva de Kaplan-Meier e respectivo intervalo de confiança a 95% para a sobrevivência dos indivíduos doentes .....	60
Figura 20: Variações entre duas consultas, intervalo de um ano na avaliação global dos doentes.....	62
Figura 21: Variações entre consultas, intervalo de um ano, na avaliação global dos indivíduos doentes .....	63
Figura 22: Variações entre consultas, intervalo de um ano, na avaliação global dos indivíduos.....	63

Figura 23: Variações entre consultas na avaliação motora dos indivíduos doentes (1ª parte) .....	64
Figura 24: Variações entre consultas na avaliação motora dos indivíduos doentes (2ª parte).....	65
Figura 25: Variações entre consultas na avaliação motora dos indivíduos doentes (3ª parte).....	66
Figura 26: Variações entre consultas na avaliação cognitiva dos indivíduos doentes.....	67
Figura 27: Sintomas comportamentais significativos nos indivíduos doentes na 1ª consulta.....	69
Figura 28: Sintomas comportamentais significativos nos indivíduos doentes na 2ª consulta.....	69
Figura 29: Depressão significativa na primeira consulta vs. apatia significativa na primeira consulta, nos indivíduos doentes .....	70
Figura 30: Valores de TFC na primeira observação vs apatia.....	70
Figura 31: Resultados da avaliação neuropsicológica e funcional dos indivíduos, por tipo de diagnóstico (1ª parte) .....	71
Figura 32: Resultados da avaliação neuropsicológica e funcional dos indivíduos, por tipo de diagnóstico (2ª parte) .....	72
Figura 33: Número de repetições CAG e gravidade da doença.....	73
Figura 34: Demonstração da diferença entre as pontuações obtidas do SF-36 da amostra deste estudo e da população portuguesa normal .....	76
Figura 35: Demonstração da diferença entre as pontuações do SF-36 e UHDRS da amostra deste estudo e da amostra do estudo referência de Ho <i>et al.</i>	76
Figura 36: Níveis de ATP nos controlos (CTR Cyb) e (HD Cyb) em condições basais e após incubação com 3-NP durante 24 h .....	79
Figura 37: Via glicolítica e via da pentose fosfato em controlos (CTR) e híbridos de doentes. (HD Cyb) .....	80
Figura 38: Análise do ATP intracelular e níveis de fosfocreatina nos híbridos de doentes e controlos .....	80
Figura 39: Níveis mitocondriais de NADH. Razão NADH/NAD em extractos mitocondriais de híbridos de doentes e controlos .....	81
Figura 40: Actividade das desidrogenases da matriz mitocondrial.....	81
Figura 41: Níveis mitocondriais de aminoácidos.....	81

# ABREVIATURAS e SIGLAS

2-DOG	2- Deoxigluçose
3-NP	3- nitropropionic Acid
ATP	Adenosine 5'triphosphate
ADP	Adenosine 5'diphosphate
BDNF	Brain Derived Neurotrofic Factor
Bold	Blood origin level
CAG	Citosina-Adenina-Guanina
CTR CyB	Control cybrids
DBS	Deep brain Stimulation
DH	Doença de Huntington
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
DTI	Difusion Tensor Imaging
FOXO	Forkhead family transcription factors
fMRI	Functional Magnetic Ressonance Imaging
G-6PD	Glicose 6-fosfato-desidrogenase
GABA	Gamma-aminobutyric acid
GB	Gânglios da Base
GBD	Goal Directed Behaviour
GPI	Globo pálido Interno
HD Cyb	Huntington's disease cybrides
HPLC	High-performance Liquid Chromatography
htt	huntingtina
MMSE	Mini Mental Status Examination
NAD	NicotinamideAdenine Dinucleotide
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydroxide
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
PGC-1 $\alpha$	Peroxisome Proliferator-activated receptor- $\gamma$ Coactivator-1 alfa
poliQ	Poliglutamina
Predict-HD	Neurobiological Predictors of Huntington's Disease
QV	Qualidade de Vida
RM	Ressonância Magnética
RNA	Ribonucleic Acid
SBMA	Spinal Bulbar Muscular Atrophy
SCA	Spino Cerebellar Ataxia

SF-36

TFC

UHDRS

YAC

Short-Form 36

Total Functional Capacity

Unified Huntington's disease Rating Scale

Yeast Artificial Chromosome

# CAPÍTULO I

## INTRODUÇÃO

### DOENÇA DE HUNTINGTON – O ESTADO DA ARTE

#### I.1. Um pouco de História

##### I.1.1. George Huntington

Fevereiro, 1872. O médico George Huntington tem apenas 22 anos e pouco mais de um ano de licenciatura. Concluíra o curso no “*College of Physicians and Surgeons of Columbia University*” e iniciara de imediato a actividade clínica na sua terra natal, East Hampton, pequena povoação rural localizada na região de Long Island. Aí seguirá as pisadas de seu pai e do seu avô. Terceira geração de médicos rurais, experiência acumulada, sentida e transmitida no seio da família. Sabemos que desde muito cedo, criança ainda, acompanhava o pai nas visitas domiciliárias - assim assentava a prática clínica de então (1). Podemos imaginar como a sua sensibilidade de menino deve ter sido afectada no contacto com os doentes, no confronto com o sofrimento, e particularmente na observação desses estranhos seres de descontrolados e exuberantes movimentos que enlouqueciam lentamente... Esse encontro marcou-o definitivamente. Podemos imaginá-lo, rapazinho assustado com a deplorável imagem que a doença exhibe. Com grande espírito de observação, o seu olhar perscrutador capta todos os sinais que depois brilhantemente irá descrever. Rigoroso, descreve com precisão, de forma exaustiva, todas as características clínicas da doença quando já possui instrumentos para o fazer. Percebe o carácter hereditário, o declínio mental e os movimentos involuntários, dançantes, que classifica de coreia e que serão os marcadores clínicos da doença. Já médico, apoquentado pela visão desses seres humanos de insanidade exposta, angustiado pela impotência em relação ao sofrimento que vê atingir famílias, decide alertar a comunidade científica (2).

E deve ser essa angústia que o impele a ir, num dia de Fevereiro de 1872, à reunião mensal da *Meigs and Mason Academy of Medicine* fazer a brilhante comunicação que dará origem à publicação “On Chorea”, no *The Medical and Surgical Reporter of Philadelphia* (3). O impacto da sua exposição foi tal, que em Abril saía a primeira publicação do texto “On Chorea”, logo reproduzida por editoras de importância reconhecida, como já o era a *Virchow Hirsch* (4).

Talvez tenha regressado a casa apaziguado com a ilusória convicção de que aquela comunidade, aqueles cientistas, encontrariam alguma solução para o padecimento que exaustivamente descrevera. Enganou-se.

Voltou à sua terra onde prosseguiu a sua vida de “João Semana” e de onde não voltou a sair. Terá continuado as visitas domiciliárias nas terras de *Long Island* assistindo sífilíticos, tuberculosos, prescrevendo enemas, sangrias, essências de cânfora. Extractos de beladona talvez. Consta na sua biografia que era um amante da natureza, de caçadas e de música, sendo um aplicado flautista (5).

Não escreveu mais nenhum artigo científico. No total, o seu legado não foi além de duas publicações: “On Chorea”, e uma anterior a esta, intitulada “Opium” que constituiu a sua tese de licenciatura. Não se lhe conhece qualquer outra investigação e, no entanto, o seu epónimo perdurou para além de si (6).

### 1.1.2 A doença antes de Huntington

Não terá sido esta a descrição inicial da doença, dizem hoje os historiadores da medicina (7). No entanto os relatos prévios não tiveram grande divulgação nem é seguro que se referissem à doença que conhecemos por doença de Huntington. Charles Waters (1841) descreveu uma afecção singular que, segundo ele, “afectava as classes mais baixas no sudeste do estado de Nova York” sendo os atingidos conhecidos como “*the magrums*”, sem que se soubesse a origem de tal designação. Diz Waters que os pacientes sofriam alterações variáveis da actividade muscular, com gravidade desigual, mas acabando todos por desenvolver gradualmente e de forma uniforme uma situação de demência. A sua arrogante descrição foi publicada num dos primeiros livros de texto de Medicina compilado por Robley Dunglison, o único que, provavelmente, lhe prestou atenção (8). Em 1860, também o médico norueguês Johan Lund descrevia, em Saetersdal, a “Coreia de S. Vitus” doença que nesta povoação parecia ter um carácter hereditário, e em que alguns doentes, no período final de suas vidas se tornavam *fatui*, isto é, demenciados.

Parece pois referir-se à doença de Huntington, mas estas publicações não tiveram qualquer impacto e não saíram do âmbito regional onde foram publicadas (9).

George Huntington demonstrou um perspicaz espírito científico ao notar as três características determinantes da afecção: o seu carácter familiar, a tendência progressiva e inexorável para a insanidade e suicídio e o facto de se manifestar na idade adulta. A sua comunicação é realisticamente descritiva, traduz uma vivência sentida. Para além disso tem o rigor e a objectividade que caracterizam o pensamento científico (2, 10).

Por essa altura ainda não se conheciam os trabalhos de Mendel sobre os padrões de hereditariedade, que viriam revolucionar a biologia estabelecendo as *Leis* que regem a transmissão das características hereditárias em todos os seres vivos. Os trabalhos de Gregor Mendel, embora publicados em 1865, permaneceram na semi-obscuridade, e só o século XX trouxe entendimento suficiente para se lhes reconhecer a merecida notoriedade. Entender a transmissão autossómica dominante desta afecção, característica realçada por Huntington, só se tornaria óbvio no século XX.

Muito tempo teria de passar até que a ciência trouxesse algum acréscimo ao legado de Huntington. No final do século XIX, a esperança média de vida continuava a ser curta e este facto talvez tenha contribuído para o escasso conhecimento de uma doença que surgia pela 3<sup>a</sup>,4<sup>a</sup> década, aproximando-se assim da idade comum de morte. A doença permaneceu muito pouco reconhecida, e as poucas publicações surgidas durante as décadas seguintes pouco acrescentaram à riqueza e precisão da descrição inicial.

Só depois da identificação da estrutura do DNA em 1953 por Watson e Crick (11) se começou a prestar maior atenção às doenças genéticas e a conhecer os fundamentos para o seu entendimento. Mas ainda assim, teríamos de esperar até 1983 para que o gene responsável pela doença fosse localizado, e mais dez anos para que a mutação genética responsável pela doença fosse descoberta (12).

### 1.1.3. O Lago Maracaibo

Como em muitas ocasiões a história repetiu-se. Em 1955, um médico venezuelano, Américo Negrette (13), também ele clínico rural numa

comunidade particularmente pobre e desafortunada que vivia da pesca, nas margens do Lago Maracaibo na província de Zulia, apercebeu-se de um vasto número de doentes que pareciam continuamente etilizados. Descoordenados, caminhavam de forma trôpega e desequilibrada (13). Da observação de muitas famílias concluiu tratar-se da Doença de Huntington, e que esta afectava várias pessoas com interligações entre si, descendentes de um antepassado comum. Examinou ele próprio dezenas de doentes de três povoações vizinhas onde a doença parecia endémica e era conhecida por “*El Mal*”. Identificou-a como doença de Huntington e levou a sua descoberta ao conhecimento dos seus pares, apresentando-a ao “6º Congresso de Ciências Médicas da Venezuela”. Posteriormente, em 1963, publicou um livro chamado: *Corea de Huntington: Estudio de una Sola Familia atraves de Varias Generaciones* (13).

O seu relevante achado não conheceu, no entanto, a importância que merecia. Escrito em castelhano, não encontrou nenhum eco extra fronteiras, e só muitos anos mais tarde um seu aluno levaria a informação a um congresso nos Estados Unidos, e o mundo tomaria conhecimento da existência de uma população com concentração elevadíssima de indivíduos afectados. O interesse pelo Lago Maracaibo foi imediato. Esta população seria a partir de então alvo da atenção das mais especializadas equipas de investigação, o que conduziria à identificação da mutação genética responsável pela doença.

Americo Negrette era um homem de sentir humilde, que também escrevia poesia, ensaios e pintava a natureza. Conta, em relato realista, a história da doença, na sua autobiografia intitulada *Ciudad de Fuego*. Morreu em 2003, tendo assistido à descoberta da localização do gene e da mutação responsável pela doença (13). Não viu, como seguramente teria ambicionado, nenhum vislumbre de cura para “*El Mal*”.

### 1.1.4. A investigação molecular

Cem anos após a histórica publicação de George Huntington “*On Chorea*” (1872) realizou-se o primeiro “International Centennial Symposium on Huntington’s Disease” em 1972 (14). O simpósio teve como objectivo reunir todos os investigadores dedicados ao estudo da doença, coligir o conhecimento então existente e definir linhas de actuação conjuntas, objectivo conseguido a julgar pela produção científica que se seguiu. Foi então que a informação sobre os doentes do Lago Maracaibo encontrou repercussão e a partir daí são constituídas várias Fundações em Instituições Académicas dos

Estados Unidos, capazes de angariar fundos para uma investigação profunda sobre esta e outras doenças genéticas.

A mais importante destas fundações, *The Foundation for Research in Hereditary Disease*, foi criada por Milton Wexler, já então reconhecido psicólogo e cientista. O acaso fizera que fosse genro de Leonor Wexler a quem fora diagnosticada doença de Huntington. Milton Wexler e a sua mulher Nancy Wexler, ambos investigadores na Universidade de Columbia, dedicaram-se desde logo à investigação da doença. Nancy Wexler parte em 1979 para o Lago Maracaibo, onde se envolve num intenso e duro trabalho de campo. Colhe informação, avalia doentes, recolhe amostras biológicas, desenha minuciosas árvores familiares, criando um completíssimo banco de dados, inigualável a qualquer outro existente (15, 16). Este trabalho pioneiro será determinante para a descoberta da localização do gene em 1983 e, posteriormente, em 1993 para a identificação da mutação genética responsável pela doença (12).

Um dramático acaso torna-se assim num marco venturoso para o conhecimento da doença.

As famílias venezuelanas abrangiam 15 409 indivíduos em nove gerações. Destes, 78% tinham idade inferior a 40 anos e pertenciam a 83 famílias distintas. A informação clínica e a investigação genética desta população permitiram a localização do gene no cromossoma 4p16.3 e subsequentemente a descoberta do defeito genético e identificação da natureza da mutação. Desde então sabemos que a mutação consiste numa expansão instável de repetições do trinucleótido Citosina-Adenina-Guanina (CAG) o que leva à expressão de uma expansão de poliglutaminas (poliQ) na proteína huntingtina. Apesar de expressa em todas as células, esta proteína causa disfunção e morte neuronal especialmente no estriado e no córtex cerebral de todos os que são portadores da sua estrutura alterada (15).

A partir de então, a história da doença de Huntington não se faz mais de nomes isolados. A descrição mais ou menos exaustiva das manifestações clínicas da doença está feita, a fenomenologia aperfeiçoou-se ao seu limite. Com o grande avanço que foi a localização do gene no cromossoma 4p em 1983, é o trabalho cooperativo, árduo e moroso de vários grupos de estudo (*Huntington Disease Collaborative Research Group*) que leva ao progresso no conhecimento da doença (17). Durante 10 anos estes grupos multidisciplinares internacionais trabalharam sem tréguas até à identificação da mutação genética, o que aconteceu em 1993, grande marco não só na história da doença de Huntington mas também das doenças de poliglutaminas em geral, (18) estando neste momento identificadas nove doenças: doença de Huntington, atrofia dentato- rubro-palidoluisiana (DRPLA), atrofia muscular espinhal e bulbar (SBMA) e as ataxias espinhocerebelosas (SCAs 1, 2, 3, 6, 7 e 17).

Inicia-se, deste modo, uma nova era. A investigação muda-se para o laboratório, processa-se agora a nível molecular. Múltiplos grupos polivalentes trabalham a diversos níveis para entender os mecanismos patogénicos da doença, o misterioso processo que leva a que uma proteína anómala contendo um resíduo expandido de poliglutaminas perca a sua normal função, origine a formação de agregados intra-celulares e cause desregulação electiva em determinados circuitos neuronais e consequente morte celular. Formaram-se centros de investigação conjunta em vários países, nomeadamente Canadá, Estados Unidos, Austrália e Reino Unido (19, 20).

Assiste-se a um momento de grande produtividade. Para se ter uma ideia, nos últimos 10 anos publicaram-se cerca de 5.000 artigos sobre a doença de Huntington, quando até finais de 1972 apenas existiam quarenta e três publicações de realce.

### 1.1.5. Os modelos animais

A história da doença completa-se com o momento crucial nas neurociências que foi o desenvolvimento de modelos experimentais criados por engenharia genética. Uma vez a mutação conhecida, pode-se produzir um modelo animal com essa adulteração, surgindo assim os ratinhos transgénicos, portadores de parte ou da totalidade do gene mutado, que proporcionam uma fonte extraordinária de investigação da doença humana a nível celular (21).

O primeiro ratinho transgénico foi criado em 1996, e desde então vários modelos foram desenvolvidos, permitindo testar sedutoras hipóteses patogénicas, com a ressalva que estes modelos não reproduzem na totalidade a doença, pois esta ocorre exclusivamente nos humanos. O fenótipo neuropatológico está bem documentado (22) e é irreproduzível nos modelos animais, o que reflecte alguma limitação nos ensinamentos que tiramos com a sua utilização. O grande contributo destes modelos é que eles, reproduzindo a disfunção celular que ocorre na doença, permitem a investigação inexequível nos cérebros dos doentes, obviamente só disponíveis *post-mortem*.

O complexo *puzzle* da patogenia da doença de Huntington não se completou ainda. Como tal, nenhum tratamento efectivo foi encontrado. No entanto, o enorme progresso na investigação dos últimos anos traz-nos legítimas expectativas para um futuro próximo.

## 1.2. O gene

A mutação responsável pela doença, como já foi dito, consiste numa expansão instável de repetições do trinucleótido CAG localizada no terminal 5' do exão 1 do gene HD, região que compreende 67 exões (IT 15 na posição 4p16.3) codificante da proteína huntingtina (htt). Consequentemente a huntingtina mutada tem um alongamento de um homopolímero de glutaminas (17) ou seja resíduos consecutivos poliglutamínicos no seu terminal NH<sub>2</sub>, 17 aminoácidos a partir do iniciador metionina (*The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993*).

9

O alelo normal (*wild-type*) transmite-se de geração em geração de uma forma mendeliana, o alelo mutado é muito instável durante a meiose, mudando o seu tamanho na transmissão intergeracional quer aumentando 1 a 4 unidades quer reduzindo 1 a 2 unidades. Os maiores acréscimos ocorrem na transmissão paterna reflectindo uma velocidade particularmente aumentada de mutação durante a espermatogénese (17).

Mecanismos patogénicos das doenças de poliglutaminas e da doença de Huntington em particular

A proteína huntingtina expressa-se em todas as células humanas embora com maior concentração no tecido cerebral. Concentrações inferiores existem no fígado, coração e pulmões. Também ortólogos da proteína foram identificados em muitas espécies (não mamíferos) incluindo o *zebrafish* e a drosófila (23). A função da proteína normal *wild-type* ainda não é completamente conhecida, e enquanto tal acontecer não serão desvendados na totalidade os mecanismos de doença.

A DH é uma doença autossómica dominante, com uma causa genética única, o que poderia sugerir que o mecanismo patogénico fosse por haploinsuficiência, isto é, o defeito genético único ser responsável pela síntese insuficiente de uma proteína necessária para a normal função celular. No entanto, o facto de não existirem deleções nem mutações pontuais no gene da huntingtina não favorece esta hipótese, não parecendo existir uma insuficiência ou perda da função mas antes "um ganho tóxico de função" do gene alterado (18).

A DH é uma das 9 doenças de expansão de poliglutaminas identificadas até hoje, grupo de doenças neurodegenerativas hereditárias com características comuns, constituindo um dos modelos de doença mais bem estudados a nível molecular. A acumulação da proteína mutada dentro dos neurónios é responsável pela sua disfunção e morte, sem que este complexo processo esteja completamente esclarecido. As mais comuns doenças de poliglutaminas

são a DH e a ataxia espinho-cerebelosa tipo 3 (SCA3), que têm distribuição mundial se bem que com incidência muito variável nos diferentes países, sendo as mais frequentes também no nosso País.

10

Chamam-se doenças de poliglutaminas porque a mutação genética, constituída por um aumento de repetições do nucleótido CAG, leva a uma expansão de resíduos de poliglutaminas na proteína mutada (poliQ). A expansão de repetições CAG é instável, tendendo sempre ao seu alongamento, o que acarreta um início de doença progressivamente mais precoce e um curso mais grave nas sucessivas gerações, fenómeno este conhecido como antecipação (24). Quanto maior o número de repetições CAG mais precoce será a idade de início da doença. O comprimento da expansão é assim responsável por 50 a 70% da variância na idade de início, sendo esta também condicionada por outros factores genéticos ou ambientais (25).

As características comuns às doenças de poliQ indicam que o efeito tóxico está relacionado com a extensão da expansão poliQ, tanto mais deletério quanto mais longa esta for (ganho tóxico de função da proteína mutada). Todas são doenças progressivas, sem remissão. Tanto a proteína normal como a mutada coexistem com concentrações sobreponíveis nos diversos tecidos. Outra característica comum é que, apesar da proteína mutada existir em todos os tecidos, ter portanto uma expressão sistémica, a citotoxicidade parece eleger alguns grupos neuronais no sistema nervoso central. Este facto sugere a existência de maior vulnerabilidade de grupos celulares selectivos, com condições locais que os tornam particularmente sensíveis ao efeito deletério do produto do gene mutado.

Desafiando esta convicção, Van der Burg e colaboradores defenderam que existem alterações fora do sistema nervoso, outros tecidos e órgãos são directamente afectados, nomeadamente o tecido muscular, o tecido sanguíneo, o osso e o miocárdio, e que as alterações que aí surgem são consequência directa da expressão da huntingtina mutada nestes tecidos periféricos (26).

Os mecanismos pelos quais a proteína mutada, neste caso a huntingtina-htt, causa neurodegenerescência incluem agregação proteica, anomalia na interacção proteína/proteína, alteração da expressão génica, desregulação dos sistemas celulares lisosomais de autofagia e ubiquitina-proteossómico, e ainda disfunção mitocondrial com consequente acumulação de espécies reactivas de oxigénio e apoptose.

### I.2.1. Ganho de função da expansão CAG

A huntingtina-htt é uma proteína com múltiplos domínios e como tal com vários desempenhos dentro da célula, alguns conhecidos, outros ainda só hipotéticos, constituindo prolífica fonte de investigação na actualidade. É uma proteína de localização preferencial intra-citoplasmática, associada a organelos como a mitocôndria, o aparelho de Golgi, o retículo endoplasmático, as vesículas sinápticas e outros componentes do citoesqueleto. Em menor concentração existe também no núcleo, onde tem por função a regulação transcripcional e o transporte núcleo citoplasma (27). Tem ainda uma importante função sináptica, no transporte intracelular de vesículas e organelos e confirmada acção anti-apoptótica intracelular. De momento foram identificadas 234 proteínas a que a huntingtina se associa (28). A huntingtina é essencial para o desenvolvimento embrionário (provado pela letalidade dos embriões dos ratinhos transgénicos com total ausência da proteína), porque a sua inexistência acelera os mecanismos de apoptose e interrupção no transporte de nutrientes maternos para o feto, mostrando que a htt mutada até um determinado nível pode compensar a ausência da proteína endógena e executar a maioria das funções da huntingtina normal (29). Parece pois que o processo de desregulação de vias intracelulares fundamentais, que termina na morte celular, ocorre com a contribuição tanto da proteína *wild-type* por um mecanismo de perda de função, como por um mecanismo de ganho tóxico de função da huntingtina-htt. A mutação parece assim conferir uma adicional e deletéria função à proteína (18, 30). No decurso da doença a htt *wild-type* vai perdendo a sua função, o que se relaciona com a progressão dos sinais clínicos, e foi já demonstrado experimentalmente nos modelos de animais transgénicos (31).

### I.2.2. Alteração das propriedades físicas e funcionais da proteína mutada

A expansão de poliQ confere novas propriedades físicas à proteína que se traduzem em numerosas anomalias no seu comportamento. A proteína mutada apresenta alterações na degradação, na localização sub-celular, na maturação pós-tradução e na interacção com outros elementos moleculares, bem como uma tendência para agregação dentro da célula. São estas alterações que induzem a multiplicidade de disfunções celulares que levarão à morte neuronal (32).

### 1.2.3. Agregados proteicos

12

O marcador anatomopatológico das doenças de poliglutaminas é a acumulação intranuclear e intracitoplasmática de agregados de poliQ nos neurónios dos doentes (33, 34), o que pode ser demonstrado utilizando técnicas de imunohistoquímica. O papel destes agregados é controverso. Não se sabe se são eles próprios patogénicos ou outros produtos intermediários, espécies mais pequenas que vão sendo geradas ao longo do processo de agregação. Os agregados podem reflectir produtos finais do evento tóxico que ocorreu a montante (35). Alguns estudos, em modelos animais têm sugerido um papel protector para as inclusões. A morte celular no estriado dos modelos animais onde estes mecanismos patogénicos foram postos em evidência, não encontrou relação com a formação de inclusões, mas sim com a presença de huntingtina mutada intra-nuclear e com a sua capacidade de activação dos mecanismos apoptóticos celulares.

De igual modo, nos cérebros dos doentes, o aparecimento de inclusões intracelulares parece correlacionar-se com a progressão da doença (36). Estas inclusões sequestram outras proteínas tais como os factores de transcrição e constituintes do proteossoma, alterando-lhes a sua normal função. No entanto, não é claro que tenham um efeito tóxico pois aparecem tanto em áreas cerebrais que degeneram como em áreas preservadas, sugerindo poder exercer, pelo contrário, um efeito protector sequestrando formas mais tóxicas da proteína mutada. Nos modelos celulares da DH as inclusões formadas pela htt mutada parecem exercer um efeito benéfico ao sequestrarem formas mais tóxicas da proteína alterada (37, 38).

Recentemente, Arrasate e colaboradores (37) sugeriram que o processo de agregação dos poliQ origina a produção de formas supra-moleculares estruturadas, tais como os oligómeros, protofilbrilhas solúveis e fibras amilóides, e que estas exercem o verdadeiro efeito de toxicidade directa atribuída aos resíduos poliQ. Assim sendo, os grandes agregados apresentariam, pelo contrário, um efeito citoprotector.

Os oligómeros têm a capacidade de se inserir nas membranas lipídicas comprometendo a sua integridade e alterando um grande número das suas funções, tais como a regulação de fluxos iónicos, a função mitocondrial e a transmissão sináptica. Actualmente, a toxicidade destes oligómeros tem sido estudada essencialmente em modelos celulares, sendo muito difícil verificar a sua existência nos cérebros de doentes, pelo que é necessário um maior número de evidências para que o seu efeito deletério seja provado (39, 40).

#### I.2.4. Clivagem proteica

A agregação das proteínas mutadas parece resultar de uma perturbação nos usuais mecanismos de degradação e eliminação das proteínas. Nos cérebros dos doentes os agregados observados são formados por fragmentos de proteínas contendo a expansão poliQ, e não pela proteína completa. Diversos estudos mostraram, *in vitro*, que quanto mais truncada é a proteína mais rapidamente se agrega, escapando provavelmente às vias de normal degradação pelo sistema proteossómico. Torna-se assim necessário identificar os fragmentos constituintes dos agregados, bem como as endopeptidases implicadas, para que seja possível o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que impeçam a proteólise. Em particular, algumas endopeptidases da família das caspases e das calpaínas estão envolvidas na proteólise da htt mutada. A caspase-6 gera um fragmento de htt mutada que se acumula no núcleo dos neurónios, sendo esse fragmento sujeito a proteólise por outras endopeptidases que originam fragmentos progressivamente mais pequenos e passíveis de agregação. Num modelo animal experimental (YAC 128) a abolição do local de clivagem das caspase-6 na htt mutada torna-a menos patogénica. Poderá pois, ser esta uma via de investigação de novas terapêuticas para a doença (41).

#### I.2.5. Modificações pós-tradução

As modificações pós-tradução podem ter um papel patogénico porque parecem conferir toxicidade à proteína mutada ao alterar a sua localização sub-celular, o seu mecanismo de proteólise assim como a sua aptidão para agregação e interacção com outras estruturas proteicas. Em todas as doenças de poliglutaminas as proteínas mutadas trazem modificações pós-traducionais diferentes das suas correspondentes normais, isto é sem mutação. A htt normal é uma proteína fosforilada em numerosos locais, enquanto a forma mutada se encontra hipofosforilada em alguns resíduos de serina (S421; S434; S536). A hipofosforilação condiciona a proteólise da htt mutada pela acção das caspases e calpaínas e também altera a sua função normal o que vai, uma vez mais, modular a sua toxicidade. Existem estudos que demonstram o papel da fosforilação nomeadamente do resíduo S421, o que enfraquece a clivagem da proteína pela acção da caspase-6, assim reduzindo a sua acumulação intranuclear (42). Como tal, nos modelos celulares em que se conseguiu induzir a fosforilação do resíduo S421 (pelo aumento da actividade de uma cinase a AKT/PKB cinase), reduziu-se a toxicidade da htt mutada (43). Da mesma forma a função de transporte axonal foi restaurada na htt mutada depois de se proceder à substituição do resíduo S421 pelo ácido aspártico o que mimetiza a fosforilação (44). A diminuição da palmitoilação da cisteína 214 está associada a uma interacção mais frágil da htt mutada com a

*huntingtin-interacting protein 14* (HIP14) e contribui também para a formação de agregados nos modelos celulares.

A fosforilação do resíduo S421 reduz a clivagem da htt pela caspase-6, diminuindo por isso a sua acumulação intranuclear.

14 Também uma diminuição da palmitoilação da cisteína 214 devida à interacção da htt mutada com a palmitoil-transferase da HIP 14 contribuiria para a formação de agregados (o que só foi observado em modelos experimentais celulares). A sumoilação e acetilação da htt mutada modelam a sua estabilidade e toxicidade em modelos animais nomeadamente no modelo drosófila.

Recentemente foi provado que aumentando a sumoilação da htt mutada, aumenta igualmente a interactividade desta com a proteína RHes o que também é factor indutor de toxicidade (45).

### 1.2.6. Interações com outros elementos proteicos

Está por explicar a vulnerabilidade de alguns grupos selectivos de neurónios em cada uma das doenças de poliglutaminas. Não existe correlação entre o nível de expressão da proteína mutada, a sua localização sub-celular e as diferentes regiões cerebrais afectadas. Poder-se-ia explicar a vulnerabilidade de diferentes áreas cerebrais pela interacção da proteína mutada com elementos proteicos existentes nesses grupos neuronais alvo. Existem diversos estudos para testar esta hipótese (32).

Assim, algumas funções da htt têm vindo a ser identificadas, nomeadamente o seu papel em processos tão variados como a endocitose, o transporte vesicular, a transmissão sináptica, a regulação de cálcio ou a transcrição via interacção com outras proteínas: *huntingtin-interacting protein 1*, *huntingtin-associated protein (Hap1)*, *postsynaptic density 95* (23).

Tem sido demonstrado que a expansão poliQ altera a afinidade da proteína e também a função de outras proteínas celulares de ligação. A htt mutada interage com a Hap1 o que perturba o transporte axonal de um factor neurotrófico essencial à sobrevivência dos neurónios estriatais, o *brain derived neurotrophic factor* (BDNF).

Outro mecanismo que na DH poderá justificar o maior envolvimento dos neurónios estriatais é o facto de a htt mutada reagir com elementos celulares de maior expressão no estriado. Nomeadamente a diminuição de afinidade da htt mutada pelo PSD95, um regulador dos receptores NMDA do glutamato,

conduz a uma entrada excessiva de cálcio intraneuronal. Por outro lado, um aumento de afinidade da htt mutada para os canais de cálcio IP<sub>3</sub>R1 torna o canal hipersensível ao IP<sub>3</sub>, um segundo mensageiro que resulta da activação do receptor glutamato mGLUR5. Percebe-se que a excessiva estimulação glutamatérgica dos neurónios estriatais conduza a um aumento de cálcio citosólico com consequente aumento da excitotoxicidade. A htt mutada interage também com a proteína Rhes, uma pequena proteína com expressão selectiva no estriado, daí resultando um acréscimo na tendência à agressão nesta área cerebral (46).

Os neurónios espiculados de tamanho médio do estriado são abundantemente enervados por axónios corticais glutamatérgicos. Como estes são o grupo celular inicialmente afectado, a teoria glutamatérgica, ao reforçar como causa de neurodegenerescência a excitotoxicidade pelo glutamato, encontra aqui o seu fundamento. Por este facto, a tomada do glutamato pelas células gliais assume particular relevância na prevenção da excitotoxicidade. Também é sabido que a htt mutada, embora expressa de forma ubíqua, tem maior tendência à formação de agregados intraneuronais do que intragliais. Em experiências em modelos transgênicos a huntingtina mutada reduz a expressão do transportador do glutamato nos astrócitos aumentando a sua ligação ao Sp1 e reduzindo a associação do Sp1 com o promotor do transportador desse aminoácido. Estes resultados mostram que a huntingtina mutada intraglial tem um importante papel na patogénese da DH, e este conhecimento trouxe abertura a um outro campo de investigação para novas abordagens terapêuticas (47).

#### 1.2.7. Efeitos tóxicos a nível do RNA

Sem dúvida que as doenças de expansão de CAG são causadas pela disfunção da proteína mutada. No entanto, questiona-se se o RNA mensageiro que transporta a expansão CAG não estará também envolvido no processo de toxicidade. Existem estudos no modelo drosófila para a SCA3 (48), mas não para a DH, que demonstram a influência da composição nucleotídica do RNA mensageiro no fenótipo da doença. Neste estudo ficou demonstrado que a expressão do RNA não codificante, que contém uma expansão CAG, induz uma disfunção neuronal progressiva na drosófila mesmo na ausência da proteína mutada, daqui se inferindo que nas doenças de expansão de poliglutaminas a degenerescência neuronal será devida não apenas à expressão da proteína contendo uma expansão poliQ mas também à expressão do RNA que codifica essa proteína.

O RNA, aparece assim como um importante alvo de investigação, não estando contudo confirmada a sua toxicidade ou envolvimento na patogénese da doença.

### 1.2.8. Disfunção Neuronal

Em todas as doenças de poliglutaminas o processo patológico inicia-se por uma disfunção neuronal causada pela proteína mutada, pelos fragmentos resultantes da proteólise, pela formação de agregados, pelo RNA, isto é vários factores todos contribuindo para a alteração da função celular. A investigação actual visa compreender o contributo de cada um destes elementos para o processo patológico e distinguir as disfunções primárias das secundárias, com o fim de melhor desenvolver estratégias terapêuticas consequentes.

A desregulação da expressão génica é uma característica comum à maioria das doenças de expansão de poliglutaminas. As proteínas mutadas têm interacções aberrantes com uma série de proteínas nucleares essenciais à regulação dos genes (49). As numerosas alterações transcripcionais que ocorrem nas doenças de expansão de poliQ incluem os genes implicados em funções celulares tais como a resposta ao *stress*, a sinalização neuronal, a regulação do cálcio e a regulação de processos de inflamação.

Defeitos metabólicos foram também evidenciados. Na DH a htt mutada liga-se directamente à membrana mitocondrial interferindo com as enzimas da cadeia respiratória e sua função. Também reprime o PGC-1alfa, um co-activador transcripcional que regula a biogénese e a respiração mitocondrial. Como última consequência a alteração mitocondrial leva à produção de radicais livres de oxigénio sendo assim responsável pela exacerbação dos mecanismos de *stress* oxidativo observados na doença.

Outro processo que leva à disfunção celular é a desregulação do sistema de degradação proteica mediado pelo proteossoma. Como os agregados proteicos intracelulares que se formam sequestram proteínas celulares, proteínas *chaperon*, também subunidades do proteossoma e da ubiquitina, todo este sistema de degradação proteica fica perturbado. Tal perturbação leva à acumulação de proteínas mal conformadas e de cadeias poliubiquitinadas. Este é um hipotético mecanismo de disfunção celular que em alguns estudos em modelos animais não foi, no entanto, confirmado (50).

Em resumo, todo o conhecimento que os modelos celulares têm possibilitado, particularmente a caracterização das vias moleculares implicadas nestas doenças, permite definir alvos para futuras estratégias terapêuticas visando o gene mutado, a proteína resultante, os defeitos funcionais consequentes e os

grupos celulares que sofrem mais intensamente o processo de neurodegenerescência (45).

### 1.3. A Patologia

As primeiras descrições anatomo-patológicas são de Jelgersma (1908) e Alzheimer (1911), e posteriormente de Dunlap (1927), Stone e Falstein (1938), McCaughey (1961). Todos referem a atrofia global existente nos cérebros dos doentes, com preferencial envolvimento do núcleo caudado e putamen (51). Algumas destas descrições enfatizam o atingimento dos lobos frontais com consequente dilatação dos ventrículos laterais (52). Cedo foi percebida a relação existente entre a atrofia do núcleo caudado e as manifestações motoras que ocorrem na doença, particularmente a existência de movimentos coreicos, sendo Jelgersma (1908) um dos primeiros a constatar e descrever esta associação (51). As séries reportadas então incluíam um número muito pequeno de cérebros, utilizavam técnicas clássicas de anatomo-patologia e centravam-se na observação do estriado, pelo que pouco contribuíram para o conhecimento da doença.

Foram os trabalhos de Vonsatell (1998) que mostraram o vasto espectro de alterações patológicas existentes na DH, para o que contribuiu o facto de ao longo de 17 anos ter tido a possibilidade de estudar mais de 1000 cérebros de doentes em várias fases de doença e, sobretudo, de indivíduos portadores da mutação mas ainda assintomáticos, cujos cérebros foram observados anos antes da hipotética idade de início da doença (53). O actual conhecimento da patologia da DH baseia-se em estudos morfométricos e na utilização de técnicas de histoquímica, imunohistoquímica e de hibridação *in situ*, anteriormente não disponíveis.

Vonsatell identificou as características topográficas e celulares da DH e estabeleceu um sistema de gradiente de severidade para estadiar a extensão das alterações patológicas no estriado, que propôs como bateria de utilização por todos os grupos de investigação (54). Ao graduar as alterações do estriado de acordo com a gravidade (numa escala de 0 a 4) utilizando apenas microscopia convencional realizada em cortes coronais clássicos, propõe uma classificação que traduz o padrão temporo-espacial de progressão da degenerescência. Vonsatell verificou que a atrofia do estriado segue uma progressão sequencial, envolvendo primeiro o pálido externo, a que se segue o pálido interno. Também no núcleo caudado o processo degenerativo tem início no seu segmento mais caudal, progredindo para o corpo, que por sua vez está mais precocemente atingido que a cabeça do núcleo caudado. O mesmo padrão de progressão ocorre no putamen, a sua porção caudal sofrendo mais intensa degenerescência que a porção rostral. A atrofia progride

seguindo um eixo dorso ventral, isto é, o processo degenerativo tem início na região mais dorsal avançando depois para a região ventral. Vonsatell concluiu que com a evolução da doença a degenerescência do estriado obedece a uma progressão caudo-rostral, dorso-ventral e médio-lateral, sendo os dois terços rostrais do neo-estriado mais vulneráveis ao processo de morte neuronal que o terço ventral, incluindo o núcleo acumbens que se encontra relativamente preservado. À rarefacção neuronal segue-se uma resposta astrocitária reaccional.

No Grau 0 classifica os cérebros de doentes já sintomáticos mas em que o aspecto microscópico é normal. Encontrou, como justificação para a ocorrência de sintomatologia clínica, a provável disfunção dos neurónios estriatais apesar da ausência de alterações estruturais. Utilizadas técnicas de contagem celular, é já notória a rarefacção na cabeça do núcleo caudado, na ordem dos 30-40 %. No Grau 1 é já evidente a atrofia da cauda e corpo do núcleo caudado, onde surge gliose astrocitária, no Grau 2 a atrofia estriatal é considerada média a moderada, no Grau 3 severa, e no Grau 4 o estriado apresenta-se severamente atrofico, tendo perdido mais de 95% dos seus neurónios. Nesta fase, o contorno da cabeça do núcleo caudado torna-se côncavo tal como o braço anterior da cápsula interna. A gravidade da atrofia do núcleo caudado encontra correlação com o envolvimento de outras áreas cerebrais. Nos estadios iniciais não existe atrofia extra-estriatal (55) mas nos Graus 3 e 4 espera-se encontrar redução marcada no pálido, no córtex, tálamo, núcleos subtalâmicos e também na *substantia nigra*. Estas estruturas sofrem rarefacção neuronal sem que se verifique a esperada resposta astrocitária, sugerindo que a astrocitose reaccional é um fenómeno confinado ao estriado.

A relevância dos trabalhos de Vonsatell advém da correlação que estabeleceu entre os diversos graus de atrofia do estriado e o envolvimento de outras estruturas nomeadamente o córtex cerebral. Nos Graus 3 e 4, Vonsatell demonstrou que o córtex cerebral pode estar marcadamente afectado, em particular as camadas III, V e VI (53, 56). Mais recentemente, em 1991, Ross e colaboradores demonstraram também o envolvimento do córtex, sobretudo das camadas V e VI. Aí, a existência de rarefacção neuronal é manifesta nos portadores assintomáticos da mutação, o que se observou na ausência de sintomatologia clínica (57).

Cérebros de portadores assintomáticos, observados muitos anos antes da idade prevista para o início da sintomatologia motora, evidenciaram um aumento da densidade dos oligodendrócitos, particularmente na cauda do núcleo caudado onde o processo patológico se inicia (56). A substância branca pode também estar envolvida e não apenas nos estadios avançados de doença. Estudos neuropatológicos demonstraram a existência de fenómenos de degenerescência focalizados nos neurónios piramidais das áreas de Brodmann 8, 9 e 10 cujas projecções se estabelecem com os gânglios da base. A hipótese

de envolvimento da via cortico-estriatal (58, 59), com disrupção das fibras mielinizadas da substância branca, tem encontrado o seu fundamento na informação fornecida pela Ressonância Magnética de Difusão (DTI). Ora, se é sabido que a proliferação astrocitária é um fenómeno reactivo e de resposta à morte neuronal, habitualmente a oligodendroglia não responde dessa forma ao processo de neurodegenerescência. Por esse facto, acredita-se que a alteração quantitativa observada no núcleo caudado de indivíduos pré-sintomáticos, traduzida no aumento significativo da densidade de oligodendrócitos poderá reflectir uma perturbação na morfogénese nos cérebros portadores da mutação genética, reflectindo assim, um defeito precoce, no desenvolvimento cerebral (60).

Vonsatell verificou que 5% dos cérebros estudados apresentavam a particularidade de manter no estriado, pequenos aglomerados de parênquima intacto, os quais conservavam normal densidade de neurónios com discreto aumento astrocitário. Estes ilhéus, como lhes chamou, não existem em número superior a cinco e não têm mais de um milímetro de diâmetro, tendo sido encontrados preferencialmente em cérebros de doentes com formas juvenis de doença, podendo reflectir um mosaicismo degenerativo (22).

No aspecto macroscópico, todas as séries referem mais marcada atrofia dos lobos frontais, com menor envolvimento dos lobos parietais. Os cérebros dos doentes perdem em média 100 gramas do seu peso. O neo-estriado contém neurónios atrofícos, sendo aí que o processo de degenerescência é mais intenso. No estriado os neurónios encontram-se dispersos, são conhecidos por "*dark neostriatal neurons*" porque contêm um citoplasma granular fino e escuro, com cromatina condensada no núcleo. O seu aspecto peculiar traduz morte celular por apoptose. O marcador patológico da DH é o gradiente e a forma progressiva de atrofia estabelecida no estriado, característica esta nunca reproduzida nos modelos animais (22).

O ritmo de degenerescência do neostriado depende do tipo de neurónios. Os neurónios espiculados de tamanho médio (*Medium Spiny Projections Neurons*), também conhecidos por células de Golgi tipo I, são gabérgicos (61), morfológicamente constituídos por um longo axónio, um corpo celular de tamanho médio e dendrites espiculadas que lhes conferem a designação de *Medium Spiny Neurons* (MSNs). Estes neurónios projectam os seus axónios para o globo pálido interno (GPI) e *substantia nigra pars reticulata*. Os interneurónios estriatais conhecidos por células de Golgi tipo II são muito heterogéneos, têm pequenos axónios, corpos celulares de tamanho variável e extensa arborização dendrítica, pelo que estabelecem inúmeros contactos sinápticos com múltiplos MSNs (62). Curiosamente são pouco atingidos no processo de doença, mantendo-se preservados até fases muito tardias. De acordo com o seu alvo, os MSNs são divididos em dois grupos: os que vão constituir a via directa ou estriato-nígrica cujos axónios se projectam

monossinápticamente no GPI ou na *substantia nigra pars reticulata* e usam a encefalina como neurotransmissor, e os que constituem a via indirecta ou estriato-palidal projectando-se no pálido externo e que expressam a substância P. De forma surpreendente, são estes neurónios que constituem a via indirecta os que são afectados mais precocemente e em maior extensão. Projectam-se para o pálido externo, utilizam GABA e encefalina como neurotransmissores e são mais vulneráveis do que os que contêm substância P e se projectam para o pálido interno. Por outro lado, os neurónios não espiculados, intra-estriatais são muito pouco afectados. A lesão da via indirecta (ou estriato-palidal) constitui a base anatomo-fisiológica da manifestação clínica mais relevante da doença, isto é, a coreia (63).

Os neurónios espiculados de médio tamanho (95% de todos os neurónios estriatais) recebem inervação directa do córtex cerebral, pelo que o seu atingimento parece resultar da excitotoxicidade glutamatérgica. Os interneurónios colinérgicos, de maior dimensão, são habitualmente poupados neste processo degenerativo (64).

Os estudos histopatológicos têm documentado a redução de fibras axonais e de proteínas sinápticas no curso da doença (65). Estudos de imagem com difusão também revelaram sinais muito precoces de degenerescência axonal na substância branca, precocemente, ainda em doentes em fase pré sintomática (66). Estas evidências indicam que as alterações nos processos de conectividade neuronal têm um importante papel na patogenia da DH, e que os neurónios afectados seguem um padrão de degenerescência do tipo *dying back*.

Este novo conceito é de particular importância porque implica outros alvos na investigação de terapêuticas inovadoras, nomeadamente o desenvolvimento de factores tróficos (47).

Recentemente em portadores assintomáticos, foi feito um estudo morfométrico focalizado à cauda do núcleo caudado, o local onde surgem as primeiras alterações patológicas, e verificou-se o aumento de densidade celular de oligodendrócitos. Utilizando técnicas de imunocitoquímica e de coloração específica para a identificação da ubiquitina, foram aí demonstrados os corpos de inclusão intranucleares, que são constituídos pelos agregados de huntingtina mutada a proteína resultante da mutação genética. Os corpos de inclusão intranucleares e intracelulares são o marcador patológico das doenças de expansões de repetições CAG e estão presentes muito tempo antes do início da sintomatologia clínica, precedendo a rarefacção neuronal e as outras alterações neuropatológicas que vão surgir no decurso da doença (67).

A investigação actual indica que a formação destes agregados de huntingtina ubiquitinada, constituindo precipitados intracelulares, representa um

mecanismo compensatório de protecção celular na fase inicial do processo degenerativo. Estes agregados existem em quantidade mais numerosa no córtex que no estriado e, no próprio estriado, são mais numerosos nos neurónios positivos para a NADPH-diaforase do que nos neurónios espiculados de tamanho médio, positivos para a calbindina, estes últimos os mais vulneráveis ao processo degenerativo na DH.

A presença de agregados intranucleares nos cérebros de portadores assintomáticos, que morreram muito tempo antes da data calculada para o início das manifestações clínicas da doença, sugere que a resposta do cérebro à huntingtina mutada se inicia precocemente, muito antes da revelação do fenótipo da doença. Muito provavelmente o processo neurodegenerativo inicia-se e desenvolve-se desde o momento do nascimento (68).

Muito importante, se bem que subvalorizado, é o trabalho de Braak & Braak (69) que demonstra o envolvimento alo cortical dos cérebros com DH, chamando a atenção para a distribuição das lesões. Braak & Braak, nos sete cérebros de doentes com doença de Huntington estudados, demonstraram a existência de um padrão regional de envolvimento *layer-specific*, com rarefacção e perda neuronal preferencialmente da região entorrinal sem reacção astrocitária. Este padrão específico de envolvimento precoce de estruturas relacionadas com o sistema límbico e hipocampo poderia justificar a sintomatologia comportamental e as alterações de personalidade que os doentes apresentam nas fases iniciais, precedendo outros sintomas, nomeadamente sintomas motores, que por convenção, determinam o início da fase sintomática desta doença.

A neuropatologia não esgotou o seu papel no esclarecimento do processo patogénico e na identificação de substratos estruturais para as pleomórficas manifestações clínicas da doença. A DH ocorre exclusivamente em humanos, como tal as alterações neuropatológicas específicas surgem apenas nos cérebros dos portadores da mutação genética. Acontece que a tecnologia aplicada ao estudo dos cérebros *post-mortem* que tem sido utilizada até ao presente, não tem permitido maior avanço, sendo inadequada para a investigação dos processos celulares que conduzem à degenerescência e morte neuronal.

A produção de animais transgénicos que mimetizam a doença constitui um grande avanço para o conhecimento da função normal da proteína huntingtina, e das interacções bioquímicas da proteína, quando mutada. A grande utilidade destes modelos advém da sua capacidade em reproduzir a disfunção intracelular e de permitir, em tempo encurtado, perceber a cascata de eventos que leva à morte da célula.

Os modelos de ratinhos portadores da mutação HD podem ser categorizados em três grupos: modelos expressando fragmentos do exão 1 do gene *htt* humano em adição aos dois alelos murinos normais; modelos *knock-in* que são modelos de ratinhos em que se inseriu CAG no CAG existente já expandido no gene *hdh* murino; e um terceiro grupo em que o gene humano está expresso em todo o seu tamanho (54). Os modelos animais, se bem que de grande utilidade, nunca ostentam a constelação de alterações que ocorrem no cérebro humano. Esta é a sua principal limitação. Não sendo perfeitos, constituem, a nível celular, o melhor modelo de doença.

Em resumo, o marcador patológico da DH é a atrofia gradual do estriado, que segue um padrão de progressão topograficamente ordenado. O envolvimento de camadas do córtex cerebral e disfunção de circuitos cortico-estriatais sugere que o processo de doença pode começar no córtex, e que a libertação maciça de glutamato pelos terminais cortico-estriatais pode ser responsável pelo aumento da excitotoxicidade no estriado e conseqüente degenerescência deste.

### 1.4. A imagem

Este é um dos campos que conheceu maior desenvolvimento na última década e cuja extensa produção veio acrescentar mais incertezas que fornecer conceitos de aceitação indiscutível.

Classicamente a neuro-imagiologia estrutural tem-se focalizado nos gânglios da base relacionando a atrofia do estriado com a progressão da doença, reconhecido que é, que esta se inicia na fase prodrómica, anos antes da doença se revelar (66, 70). Os estudos multicentricos longitudinais Predict-HD (*Neurobiological Predictors of Huntington's Disease*) e TracK-HD (um estudo observacional, longitudinal, sem tratamentos experimentais em pré sintomáticos e estadios precoces de doença) forneceram suficiente informação para concluir que a atrofia estriatal se inicia precocemente, até 15 anos antes do início previsível da doença (19 20). Mais, a informação cruzada obtida através de estes estudos longitudinais indica que a volumetria estriatal tem correlação directa com o tempo previsível para o início da sintomatologia motora da doença, daqui se inferindo que na fase prodrómica a medição do volume do estriado pode ser um bom marcador de doença (71). Um importante estudo, embora referente a um número pequeno de doentes (n=19) em fase pré sintomática, demonstrou que existem alterações longitudinais evidenciadas a partir de 10 anos antes do início previsível da doença e, mais importante, que quando surge sintomatologia clínica já se perderam 50% das células estriatais (72). À semelhança do que acontece com outras doenças neurodegenerativas, nomeadamente com a doença de Parkinson em relação à rarefacção dos neurónios dopaminérgicos, também aqui o limiar para a

ocorrência de sintomas é muito alto, estes só se revelando quando já se perderam mais de 50 % dos neurónios do estriado.

Frequentemente as alterações cognitivas ou comportamentais precedem a sintomatologia motora, o que trouxe novo direccionamento à imagiologia, que se orientou para a pesquisa do envolvimento de outras áreas cerebrais fora dos gânglios da base nos indivíduos pré-sintomáticos, na expectativa de uma vez mais, se encontrarem marcadores de doença (73, 74). Curiosamente os primeiros resultados destes estudos sugeriram que a rarefacção da substância branca poderia também ser um indicador sensível da progressão da doença, mesmo no período prodrómico. Estes achados na substância branca foram posteriormente explorados utilizando a Ressonância Magnética de Difusão (75, 76) e demonstrou-se que a anisotropia fraccional tanto está aumentada como reduzida de forma significativa, em função do estadio da doença. Mais importante, a *Difusion Tensor Imaging (DTI)* indicou que as alterações de tecido já existem nos doentes pré-sintomáticos ainda na ausência de alterações volumétricas visíveis, sugerindo que subtis modificações morfológicas ocorrem antes da morte neuronal. Outras alterações, incluindo o volume de líquido céfalo-raquídeo e redução do espessamento cortical, têm sido irregularmente demonstradas. Embora a redução da espessura cortical possa ser detectada durante a fase pré-clínica da doença e pareça relacionar-se com alguns sintomas, existem demasiadas diferenças metodológicas e discrepâncias nos estudos existentes e nos consequentes resultados obtidos para que estes possam ser correctamente valorizáveis. Porque estes estudos utilizam diferentes metodologias na análise dos resultados obtidos e das técnicas aplicadas, assim como grande heterogeneidade nas amostras estudadas, é difícil verem validados os seus resultados. De forma consistente, a diferença entre indivíduos normais e pré-sintomáticos reside na volumetria dos núcleos da base (77).

#### 1.4.1. Ressonância Magnética Funcional

A utilização da Ressonância Magnética Funcional (fMRI) na DH tem essencialmente dois objectivos: por um lado identificar e caracterizar a disfunção existente na doença e, por outro, desenvolver um biomarcador que possa servir para diagnóstico pré-sintomático nos indivíduos portadores da mutação (78).

Num estudo pioneiro, desenhado para avaliar o impacto da disfunção causada pela doença em vários domínios neuronais, os doentes eram submetidos a fMRI enquanto executavam algumas tarefas específicas, para serem depois comparados com indivíduos saudáveis (79). Verificou-se que no grupo dos doentes existe um aumento cortical e subcortical nas respostas *Bold (Blood*

*origin level dependence*) na performance *maze*, especialmente nas áreas de processamento motor e visual. A ausência de inibição nas respostas motoras também encontrou correlação com a alteração observada nos padrões de activação dos núcleos caudados e dos tálamos. Este conjunto de alterações na activação que a fMRI veio demonstrar, sugere que o processo de neurodegenerescência (representado pela diminuição de activação) a nível dos gânglios da base leva a um recrutamento compensatório (representado por hiperactivação) de vias motoras acessórias.

O segundo objectivo, encontrar um biomarcador que possa permitir o diagnóstico precoce e assim definir o início da doença em portadores assintomáticos, é muito mais ambicioso e, até à data, não alcançado. Têm-se desenvolvido vários paradigmas baseados nas informações colhidas na fMRI, mas são necessários mais estudos para validar os achados encontrados, de modo a permitir uma indicação para a sua utilização na prática clínica (80). Nos doentes em fase sintomática observa-se um padrão de hipoactivação nos gânglios da base, relacionado com a execução de uma tarefa, o qual é precedido por aumento de activação no núcleo caudado, tálamo e córtex fronto-temporal. Tais achados têm sido interpretados como um mecanismo de compensação ocorrendo precocemente no local onde se inicia o processo neurodegenerativo. Um estudo de referência mostrou ausência de activação da porção antero-dorsal da ínsula esquerda nos indivíduos pré-sintomáticos, durante a execução de uma tarefa de reconhecimento de expressões faciais que traduziam emoções, com particular ênfase para o reconhecimento do nojo (81). Ainda nos indivíduos pré-sintomáticos têm sido encontradas diversas alterações que podem surgir muitos anos antes da data estimada para o início da doença, precedendo 12 anos o irromper dos sintomas motores (78).

Existem, desde 2002, vários estudos com fMRI que exploram anomalias neuronais e cujos resultados apontam quer para a hipoactivação quer para a hiperactivação de diferentes regiões cerebrais, de acordo com a tarefa que está a ser executada. Infelizmente estes estudos não conseguiram identificar circuitos envolvidos nos *deficits* cognitivos observados, apesar de serem capazes de demonstrar alterações funcionais ainda em fases pré sintomáticas da doença. Demonstraram também que existem diferenças na activação de áreas cerebrais e estas são detectáveis antes do declínio na execução duma tarefa em estudo (82-84). Apesar de estes resultados serem muito interessantes, referem-se a estudos realizados em pequenos grupos, como tal a necessitar de validação, não existindo nenhum teste que de forma clara permita estabelecer o risco de doença, nos indivíduos em fase pré - clínica.

Em Fevereiro de 2010, o *Dementia Research Centre* apresentou o primeiro estudo longitudinal com Ressonância Magnética (RM) e volumetria na DH (77). Este estudo demonstrou a utilidade da RM com quantificação de volumes como processo capaz de detectar a progressão da DH antes da emergência de

sintomas clínicos. O estudo foi desenhado de forma a detectar, no seguimento longitudinal de indivíduos pré-sintomáticos portadores da mutação, quais as alterações volumétricas das estruturas alvo. O seu grande objectivo é definir a possível utilidade desta técnica na avaliação de terapêuticas neuroprotectoras ou modificadoras do curso da doença. Não existe nenhum fármaco, de momento, que tenha provado ser modificador do curso natural da doença. No entanto, várias substâncias em experimentação animal têm-se revelado muito promissoras. Noutras patologias, nomeadamente na doença de Alzheimer, estudos longitudinais com RM têm sido usados para avaliar a eficácia de fármacos, e o mesmo se passará em futuros ensaios clínicos na DH.

Com convicção, pode apenas afirmar-se que quando os sintomas motores da doença surgem existe já acentuada atrofia do núcleo caudado com redução do seu volume na ordem dos 2.58 ml e alargamento do volume ventricular de 9.27 ml. A redução do volume do caudado inicia-se cerca de 15 anos antes do claro despontar de sintomas motores e mostra muito estreita variabilidade entre os indivíduos doentes. Por sua vez, os ventrículos sofrem alargamento cerca de 5 anos antes do início clínico da doença, aparentemente uma década após o início do processo de atrofia dos núcleos caudados. Estes achados sugerem que as alterações longitudinais na volumetria do núcleo caudado podem constituir um marcador precoce da doença, traduzindo as alterações patológicas que este está a sofrer, muitos anos antes do previsível início dos sintomas motores.

### **1.5. A doença e os doentes**

A doença não é mais que a expressão fenotípica da mutação genética. Os portadores da mutação podem ser identificados muito antes do início das manifestações clínicas graças ao teste genético disponível desde 1993 o que representa um marco importante na medicina molecular (85). É uma doença neurodegenerativa com particular envolvimento dos neurónios estriatais espiculados de médio tamanho, gabérgicos, e rarefacção das camadas V e VI do córtex cerebral. Estas modificações, envolvendo preferencialmente o córtex pré-frontal e o estriado, vão originar os *deficits* progressivos, com desorganização do movimento voluntário, ocorrência de movimentos involuntários, declínio cognitivo e alterações psiquiátricas, com manifesto reflexo na qualidade de vida dos doentes, e morte prematura.

A sintomatologia motora tem sido exaustivamente estudada e tem recebido maior atenção, dada a facilidade de utilização de escalas que permitem uma avaliação semiológica detalhada e padronizada. Estudos recentes têm-se focalizado essencialmente na pesquisa de manifestações motoras mais subtis e

de aparecimento precoce nos portadores da mutação, antes da evidência dos sinais clássicos que permitem o diagnóstico clínico de doença (86).

A manifestação *major* é, no entanto, a coreia, definida como movimento involuntário, ondulante, inesperado que surge ao acaso em diversos grupos musculares, de início distal, progredindo depois para outros segmentos proximais e axiais. A coreia está presente durante todo o tempo de vigília do doente, não tem um padrão único, sendo característico o envolvimento da musculatura facial, elevação das sobrancelhas, enrugamento da testa, protusão da língua e trejeitos dos lábios. Peculiares são também os movimentos de extensão que envolvem a musculatura dorso lombar, conferindo uma postura característica ao doente e contribuindo para as dificuldades da marcha. Durante o curso da doença podem surgir outros sinais motores: disartria, disfagia, distonia, alterações do tonus, ataxia e sinais piramidais, traduzindo o envolvimento de múltiplas estruturas cerebrais (87).

As manifestações psiquiátricas são muito frequentes, entre 33 a 76%: a depressão e a apatia são comuns, bem como a ansiedade e a irritabilidade que são sintomas dos estadios iniciais e se mantêm ao longo da evolução da doença.

Na literatura é sempre referido o risco de suicídio, aumentado nos estadios iniciais da doença e nos portadores assintomáticos. A existência de depressão, o isolamento, a deterioração cognitiva inicial (ainda com *insight*) e a idade jovem parecem funcionar como factores de risco (88). O suicídio na DH é cinco vezes mais frequente do que na população geral, existindo um estudo onde os autores estimam que ao longo do percurso de doença mais de 25 % dos afectados têm comportamentos suicidas, isto é fazem pelo menos uma tentativa de suicídio (89). Por outro lado, contrariamente ao que vulgarmente se acredita, receber o diagnóstico de uma doença devastadora não aumenta, pelo contrário pode mesmo diminuir o risco de cometer suicídio (90).

O declínio cognitivo é das mais marcantes características da doença. É universal, pode anteceder as outras manifestações ou surgir nas fases mais avançadas. Caracteriza-se por alterações nas capacidades visuo-espaciais e por um síndrome dis-executivo, com incapacidade no planeamento, organização e avaliação de tarefas, característica das demências subcorticais das quais a demência da DH é o paradigma (87).

Falta de iniciativa, deficit de atenção, alteração da memória de trabalho e da linguagem, esta com fluência reduzida e incapacidade na alternância entre categorias semânticas são transtornos que têm imenso impacto na capacidade de comunicação confinando os doentes ao isolamento (19, 91, 92).

### I.5.1. Outros sintomas da doença

Toda a investigação da doença tem sido centrada no sistema nervoso central. No entanto, uma vez que a huntingtina se expressa em todos os tecidos, é provável que exerça acção deletéria a nível desses outros tecidos. Algumas manifestações clínicas, como a acentuada perda de peso e a redução de massa muscular nos doentes, têm sido consideradas secundárias à deterioração neurológica. O facto de, por vezes, serem precoces e nem sempre aparecerem associadas a disfunção cerebral, tem vindo a sugerir que resultam do efeito directo do agente causal, ou seja da acção da proteína mutada nos tecidos periféricos. Esta questão tem suscitado enorme interesse porque, a serem reconhecidas alterações periféricas nomeadamente no músculo ou em células sanguíneas, a identificação de biomarcadores em tecidos mais acessíveis será facilitada, o que ajudará na investigação e na experimentação de novas terapêuticas (26).

27

Na realidade, a huntingtina, cuja função não está completamente identificada, tem uma expressão universal em todos os tecidos e órgãos dos mamíferos. De igual modo, os agregados intranucleares que são o marcador patológico da doença, estão presentes nos tecidos periféricos dos animais transgénicos. Outra evidência em favor do envolvimento mais sistémico da doença demonstrou-se em células isoladas de doentes, nomeadamente monócitos. Nestas células, depois de isoladas, a disfunção manteve-se mostrando não ser consequência da alteração cerebral mas antes efeito directo da huntingtina endogenamente expressa (93, 94). Existem, pois, distintas evidências que apontam para um envolvimento multi-órgão.

Particularmente relevante é a acentuada perda de peso que todos os doentes desenvolvem ao longo do processo de doença, apresentando profunda caquexia nos estadios mais avançados. De acordo com diversos estudos, a maioria efectuados nos modelos transgénicos, vários tecidos e órgãos implicados na regulação do peso corporal podem estar afectados na doença. No modelo R6/2 de ratinho, um dos modelos mais explorado no estudo da DH, o número de células produtoras de grelina está consideravelmente reduzido no estômago. A grelina é uma hormona que estimula a ingestão de alimentos e inibe o consumo de energia. Por esse facto, uma redução nesta hormona poderá contribuir para a perda de peso. O pâncreas também pode estar afectado e, quer os doentes quer os modelos animais desenvolvem intolerância à glicose. Nos ratinhos observou-se atrofia dos ilhéus pancreáticos com inclusões intranucleares, resultando numa deficiente produção de insulina, somatostatina e glucagon. Nos doentes, apesar dos ilhéus pancreáticos serem de tamanho normal, a desregulação nos factores de transcrição nesse local pode estar subjacente à tendência para desenvolverem intolerância à glicose. Um único estudo em modelos transgénicos indica que a huntingtina mutada pode afectar também o fígado (95). Nesse modelo,

alterações transcricionais nas enzimas do ciclo da ureia levaram a concentrações aumentadas de amónia circulante com conseqüente agravamento de lesão cerebral. Outro marcador da doença é a redução da massa muscular, sendo os mecanismos subjacentes ainda desconhecidos. Postula-se que a própria huntingtina mutada se encontra nos miócitos, sendo directamente responsável pela atrofia muscular (96). Diversas anomalias periféricas parecem ocorrer independentemente do processo de degenerescência neuronal, no entanto, até ao presente, apenas descritas em modelos animais. Tais defeitos podem ser consequência directa da expressão da proteína mutada.

O reconhecimento destas alterações pode levar a um melhor entendimento da patogenia da doença, atendendo a que os tecidos periféricos são de muito melhor e mais fácil acessibilidade. Isolar células sanguíneas é um processo pouco invasivo, facilmente realizável durante a vida dos doentes.

Em conclusão: o fenótipo clínico da doença tem sido minuciosamente descrito, existindo suficiente informação sobre a correlação fenótipo/genótipo, particularmente desde que se tornou disponível o acesso a um teste simples que pode informar os indivíduos em risco sobre a sua situação de portador ou não da mutação, isto é da doença. Por isso, de particular interesse é a avaliação regular dos indivíduos assintomáticos que podem, a qualquer momento, manifestar sintomas e sinais que indiciarão o início da doença.

Não existe ainda consenso sobre esse momento, uma vez que só os sintomas motores são perfeitamente objectiváveis. Os sintomas cognitivos e comportamentais revelam-se de forma insidiosa, tornando insegura a presunção de uma data para o seu início.

Estão a decorrer estudos multicentricos dirigidos aos indivíduos portadores assintomáticos, isto é, aqueles que depois de submetidos a um teste preditivo viram confirmada a presença da mutação responsável pela doença. Estes são alvo de maior investigação, que tem como objectivo a identificação de biomarcadores de doença, que se pretendem precoces para que os indivíduos portadores da mutação possam beneficiar o mais cedo possível de terapêuticas neuro-protectoras.

### 1.6. Epidemiologia

A DH é uma doença rara, no entanto é a mais comum das doenças autossómicas dominantes do adulto (97). Na maioria das populações a prevalência é estável, afectando 4 a 10 pessoas por 100.000 habitantes. As excepções existem nas populações onde se verifica o efeito fundador, como na

Tasmânia e na Venezuela, na região do Lago Maracaibo (98). Aqui a prevalência é de cerca de 700 por 100.000 habitantes. Na Tasmânia embora os dados epidemiológicos não sejam recentes verifica-se também uma prevalência de 12 por 100.000, mais elevada que nos restantes países (99). Nesta ilha Australiana, Pridmore identificou seis linhas descendentes de uma só mulher que trouxera a doença para a ilha, perfazendo um total de 765 pessoas em risco para a doença (99).

No Japão a prevalência é muito mais baixa que na Europa e Estados Unidos, afectando 0.5 por 100.000 ou seja cerca de 10% mais baixa que no mundo ocidental. A população africana tem também uma prevalência reduzida (a ausência de estudos epidemiológicos dificulta esta informação), no entanto nas áreas onde existe fusão com a população branca a frequência é mais alta (100, 101). Na população branca a incidência é mais alta quando comparada com a população africana ou asiática, o que é justificado pela ocorrência mais frequente nesta população de alelos com repetições entre 25 e 35 CAG, alelos chamados grandes, intermédios que são instáveis e como tal passíveis de originar mutações *de novo*.

Assim sendo, na Europa haverá entre 30.000 a 40.000 pessoas que sofrem de DH, e cerca de um número três vezes superior se considerarmos os indivíduos em risco, isto é os familiares de 1º grau dos doentes com doença manifesta (97). Pensa-se que haverá também uma frequência de novas mutações entre 1 e 3%.

Na população geral o número de repetições do trinucleótido CAG no gene HD varia entre 6 e 35. A expansão com repetições acima de 40 está invariavelmente associada a doença com penetrância completa, entre 36 e 39 a penetrância é reduzida, e os alelos normais, com número de repetições de trinucleótidos entre 27 e 35 repetições CAG são considerados grandes intermédios, mostrando neste intervalo grande instabilidade, com possibilidade de na geração seguinte se expandirem para o intervalo em que já conferem doença, particularmente se a transmissão se fizer pela linha paterna. A frequência destes alelos intermédios tem sido estimada em 3.9%, percentagem obtida num estudo de uma população seleccionada e seus parceiros (102). Mais recentemente, Sequeiros e colaboradores encontraram uma frequência de 7% destes alelos na população portuguesa (103). No entanto um outro estudo mostrou prevalência muito mais baixa, inferior a 1% (104). Este conceito é relativamente controverso, têm sido reportados alguns casos raros, em que o fenótipo de doença se manifestou em indivíduos que possuíam um número de repetições no intervalo do alelo intermédio. Recentemente foram comunicados dois novos casos de doença com um número de repetições CAG intermédio. Em ambos o início de sintomatologia foi tardio, desenvolvendo no entanto inquestionáveis sintomas de doença (105).

As razões para a ausência de informação sobre a real prevalência desta patologia prendem-se com o desconhecimento ainda existente da doença, com o facto de que até há muito pouco tempo o diagnóstico era exclusivamente clínico e, lamentavelmente, com o estigma que esta ainda encerra obrigando a que famílias escondam a sua situação (106). Este facto tem dificultado muito a investigação da DH, particularmente no que diz respeito à determinação da sua real prevalência.

Na Europa e nos Estados Unidos tem havido algum esforço para realizar estudos epidemiológicos que ajustem a prevalência da DH (107). Em 2010, o Parlamento do Reino Unido apelou à *Huntington Disease Association* britânica para que apresentasse uma estimativa do número de doentes existentes no momento actual, ao que a Associação respondeu apontando para 12.4 por 100.000 habitantes (108). Pensamos assim, que a prevalência na Europa será também um pouco superior ao que habitualmente é reportado. Em Portugal haverá cerca de mil e duzentos doentes com DH, não existindo até ao momento nenhum estudo epidemiológico que suporte estas estimativas.

### 1.7. Terapêutica

Os agentes depletos e antagonistas dopaminérgicos têm sido o grupo farmacológico mais utilizado para o controlo dos movimentos coreicos. Antidepressivos, antagonistas do glutamato, antiepilépticos e outros fármacos são utilizados na DH para tratamento sintomático. Existem várias publicações sobre o tratamento sintomático da doença (109, 110) mas nenhum estudo foi feito com tempo suficientemente longo e em dupla ocultação de forma a possibilitar a recomendação de estratégias terapêuticas. A primeira revisão do tratamento farmacológico da DH baseada na evidência (revisão *Cochrane*), surgiu em 2006 (111). Nesta revisão foram analisadas 218 publicações referentes a intervenções farmacológicas publicadas desde 1965. Destas, só 20 puderam ser classificadas de nível 1, 55 nível 2, 54 de nível 3, e 89 eram referentes a casos esporádicos. Os autores concluíram pela existência de alguma evidência para o tratamento da coreia com haloperidol ou flufenazina, menor evidência para a utilização da olanzapina, e muito baixa evidência na utilização de fármacos como a amitriptilina, risperidona e olanzapina no tratamento da depressão e psicose. A conclusão desta revisão que analisou 21 estudos de nível I, não permitiu elaborar nenhuma recomendação para o tratamento da DH.

Na última revisão sistemática da literatura pelo grupo *Cochrane* (112) visando a avaliação da eficácia de diferentes intervenções terapêuticas no controlo sintomático da DH, os autores incluíram 22 ensaios clínicos englobando 1.254 participantes. Os estudos avaliados foram de curta duração, entre 2 e 80

semanas, e das várias intervenções farmacológicas avaliadas (anti-dopaminérgicas, anti-glutamatérgicas e com metabólitos energéticos), apenas a tetrabenazina demonstrou uma clara eficácia no controlo dos movimentos coreicos. Todas as restantes terapêuticas não mostraram qualquer eficácia.

Existe grande expectativa em relação a fármacos que possam alterar o curso da doença que tenham um efeito neuroprotector. A revisão *Cochrane* dedicada à avaliação de estratégias neuroprotectoras na DH, identificou oito estudos duplamente cegos versus placebo com um total de 1.366 pacientes incluídos (113). O tempo de tratamento foi em média de 52 semanas, e os fármacos experimentados incluíram a vitamina E, a idebenona, o baclofeno, o lamotrigénio, a creatina, a ubidecarona/remancemide, o ácido etil-eicosapentanoico e o riluzol. A conclusão desta meta-análise foi pela inexistência de qualquer efeito neuroprotector exercido por estes fármacos, embora a sua tolerabilidade e segurança não implicassem riscos.

Nenhuma terapêutica atrasa o curso da doença. No entanto, estão em desenvolvimento estratégias cujos alvos são outros receptores para além dos receptores dopaminérgicos, nomeadamente os receptores da adenosina e canabinoides. Substâncias de reconhecidas propriedades antioxidantes, antiglutamatérgicas e anti-inflamatórias estão em experimentação. Em particular os canabinoides encontram-se em fase de investigação nesta, e em outras doenças neurodegenerativas (114).

A Estimulação Cerebral Profunda (Deep Brain Stimulation/DBS) e o transplante de células fetais são procedimentos em fase experimental no momento presente. A DBS com alvo no globo pálido interno (GPi) está indicada no tratamento das discinésias da doença de Parkinson. Com fundamento nesta informação foi praticada em 2004 a primeira DBS num doente com DH cujos movimentos involuntários foram refractários à terapêutica médica até aí efectuada (115). Este doente não apresentava alterações psiquiátricas ou comportamentais que contra-indicassem a utilização da DBS. A coreia e distonia melhoraram, melhoria dependente da frequência de estimulação. Por outro lado, a bradicinésia agravou com o aumento dessa frequência. Mesmo tendo sido demonstrado que a DBS pode ser eficaz, a curto prazo, no controlo da coreia, este procedimento não pode ser recomendado por não ser possível prever a sua eficácia a longo prazo (115).

Vários estudos com número muito reduzido de pacientes, e a título experimental, têm sido feitos com implantes de células fetais colocadas no putamen e no núcleo caudado. O primeiro implante realizou-se em 1995, sendo em 1998 publicada uma pequena série de pacientes em que foi utilizado este procedimento. Estes estudos iniciais são de interpretação difícil, por terem

muito pequeno número de doentes, e ainda, por não poderem ser realizados de forma duplamente cega, versus controlos. É por isso prematuro tirar qualquer conclusão a propósito do benefício da utilização de transplantes celulares (116).

**32**

Mais recentemente experimentou-se a estimulação magnética transcortical (EMT) na DH com o objectivo de controlar as alterações motoras da doença e testar uma possível eficácia nas manifestações não motoras desta, como a depressão e outros sintomas comportamentais (117). O fundamento para a sua utilização terapêutica reside no facto de a EMT poder limitar o processo de *stress* oxidativo induzido pela *htt* mutada (118), mas estes estudos de intervenção na excitabilidade do cortex encontram-se ainda em fase inicial.

# CAPÍTULO II

## MATERIAL E MÉTODOS

### II.1. Os doentes

Entre Janeiro de 2000 e Maio de 2010 foram observados 185 doentes, ou familiares em risco, de doentes com diagnóstico confirmado de DH. Todos seguiram o mesmo protocolo de avaliação e os registos uniformizados foram recolhidos em base de dados construída para o efeito.

#### II.1.1. Metodologia utilizada na Avaliação Demográfica e Clínica

O Registo Demográfico e a caracterização da população foram feitos de acordo com um protocolo de recolha de dados onde consta:

- Naturalidade;
- Data nascimento;
- Sexo;
- História Familiar - hereditariedade paterna, materna, desconhecida;
- Idade de início dos primeiros sintomas;
- Diagnóstico Genético: Número de repetições do trinucleótido CAG, número de repetições do trinucleótido CAG no progenitor afectado;
- Caracterização do fenótipo clínico;
- Escolaridade em número de anos;
- História médica e farmacológica;
- Co-morbilidades;
- Avaliação Clínica:
  - Avaliação médica geral
  - Avaliação neurológica

Foram utilizadas as seguintes escalas:

*Unified Huntington's Disease Rating Scale* (UHDRS). A UHDRS é uma escala de avaliação clínica, estandardizada, validada, cobrindo várias componentes da doença: a componente motora, cognitiva e psiquiátrica/ comportamental (119). A avaliação é completada por uma escala de independência (percentual), uma escala de Capacidade Funcional Total, e um questionário de avaliação de qualidade de vida Short-Form-36 (SF-36)(120). Depois do exame detalhado, esta escala ainda contempla um item onde o clínico é confrontado com o seu grau de confiança ou certeza para o diagnóstico de DH (119). A UHDRS é um pormenorizado instrumento utilizado como peça fulcral por todos os grupos de investigação.

34

O *score* motor total é obtido pelo somatório da pontuação de 31 itens que avaliam diferentes sinais motores, nomeadamente os movimentos oculares de perseguição verticais e horizontais, as sacadas oculares sua iniciação e velocidade, verticais e horizontais, disartria, protusão da língua, movimentos dos dedos, movimentos de pronação supinação das mãos, teste de Luria, rigidez, bradicinésia, distonia tronco e membros, coreia da face peribucal e membros, reflexos posturais e a marcha. A pontuação nesta escala varia entre 0 e 124, os *scores* mais altos a indicarem maior compromisso motor.

O estado geral dos participantes é então classificado de acordo com a escala de Shoulson e Fahn (121), traduzindo o grau de incapacidade, e variando entre 0 e 5, os *scores* mais baixos indicando melhor funcionalidade, isto é maior integridade e preservação de funções. Esta classificação é feita pelo clínico, integrando a informação do paciente e seus familiares e tem em consideração a capacidade do doente no desempenho de actividades correntes do dia-a-dia tais como manter profissão e emprego, tomar conta de si próprio, gerir as finanças, fazer a sua higiene e alimentação. Cada categoria é graduada de 1 a 5. A escala origina 5 estadios de acordo com a severidade da doença.

Os indivíduos incluídos são considerados sintomáticos quando apresentam inequívocos sinais motores pontuando acima de quatro pontos na componente motora da UHDRS.

A componente de avaliação comportamental e psiquiátrica da UHDRS inclui 28 itens que quantificam a gravidade e a frequência de vários sintomas comportamentais. O *score* de avaliação psiquiátrica (122) é obtido pelo somatório do produto da frequência pela gravidade de 11 diferentes sintomas psiquiátricos (depressão, baixa auto-estima, ansiedade, pensamentos suicidas, agressividade, irritabilidade, comportamentos compulsivos, obsessivos, alucinações, ilusões e apatia). A avaliação é feita nos moldes de entrevista semi-estruturada, tendo o clínico a flexibilidade de introduzir questões adicionais, que ajudem a identificar os sintomas psiquiátricos. O *score* total

varia entre 0-176, sendo os *scores* mais altos indício de maior compromisso comportamental. A frequência dos sintomas psiquiátricos é graduada de 0 a 4, zero significando a ausência de sintoma e quatro a sua existência em permanência. A gravidade do sintoma também é pontuada entre zero, sem qualquer gravidade, e quatro, indicando maior severidade desse sintoma interferindo na actividade do indivíduo. Em concordância com a proposta de quantificação referida por Marder (123) a frequência de um sintoma é multiplicada pela gravidade do mesmo de forma a ser obtido um *score* composto.

A escala de capacidade funcional é preenchida através da informação do doente ou do seu acompanhante e consta de um questionário de 25 perguntas cobrindo diversas tarefas da vida diária, desde a capacidade para manter profissão remunerada até às tarefas de higiene e alimentação executadas sem auxílio. A resposta a este questionário é afirmativa ou negativa, pelo que o máximo de pontuação será 25 pontos, que indicará maior capacidade funcional. Aplica-se uma outra Escala de Funcionalidade a “Total Functional Capacity” (TFC), elaborada por Shoulson, Kurlan, Rubin em 1979 (124) que avalia a capacidade do doente para executar tarefas da vida diária não só elementares, básicas, como instrumentais. Esta é também uma escala obtida pela informação quer do paciente quer do acompanhante, e varia entre 0 e 13, o *score* mais alto traduzindo maior funcionalidade.

A avaliação cognitiva é feita através da aplicação de três testes que integram a componente cognitiva da UHDRS: um teste de fluência verbal, que reflecte o número de palavras correctas produzidas por minuto (séries de três), o teste Símbolo-Dígito, que reflecte o número de itens produzidos em 90 segundos e o teste de *Stroop Color-Word*, que reflecte o número de itens correctos na bateria de interferência do *Stroop* num período de 45 segundos (125). Para todos os três testes cognitivos, *scores* mais altos traduzem melhor capacidade cognitiva.

O teste de *Stroop* consta de três elementos: um teste de leitura de palavras, contabilizadas num intervalo de 45 segundos, quantificando-se o número de palavras que o indivíduo consegue ler; um teste de nomeação de cores durante o mesmo intervalo de tempo, em que as cores constantes são o azul, o vermelho e o verde, e um teste de interferência, em que o indivíduo tem, em 45 segundos, de nomear as cores de palavras com estímulo ambíguo (por exemplo a palavra azul está escrita a cor vermelha, tendo o indivíduo que inibir a leitura da palavra e dizer o nome da cor em que a palavra está escrita, sendo neste exemplo a resposta: vermelho). Este teste pretende avaliar funções executivas, atenção selectiva, flexibilidade cognitiva e velocidade de processamento.

É esperado que quanto maior a deterioração cognitiva menor o número de palavras, cores, cor da palavra, sejam proferidas em 45 segundos. Este teste não apresenta uma cotação máxima, um tecto de pontuação. A pontuação de cada sub-prova resulta do somatório do número de itens que o indivíduo consegue ler/dizer. Obtêm-se 3 pontuações separadas. Estes testes são influenciados pelo nível de escolaridade do avaliado.

No teste da Fluência Verbal Literal, o indivíduo terá de dizer o maior número de palavras começadas pela letra P durante 60 segundos, bem como o maior número de palavras começadas pela letra M e pela letra R, durante igual intervalo de tempo. Tal como o anterior não tem uma cotação máxima. A pontuação total é a soma do número de palavras que o indivíduo conseguiu dizer para as 3 letras. Altamente dependente do nível de escolaridade do indivíduo, é um teste que avalia a fluência verbal fonémica, a capacidade em estabelecer associações verbais. Avalia as estratégias que o doente possui para evocar palavras que correspondam à letra pedida.

No teste Símbolo-Dígito o indivíduo tem de preencher uma grelha com algarismos, durante 90 segundos, fazendo a correspondência entre algarismo/símbolo de acordo com a chave de codificação presente na folha de resposta. A pontuação corresponde ao número de algarismos correctamente preenchidos. O valor máximo nesta prova é de 125 pontos. Avalia a velocidade de processamento visuo-motor, aprendizagem, atenção e concentração.

É esperado que, com a progressão da doença, o número de algarismos que o indivíduo é capaz de preencher em 90 segundos vá diminuindo gradualmente. Também não tem uma cotação máxima. A pontuação de cada sub-prova obtêm-se somando o número de itens que o indivíduo consegue ler/dizer. Tem 3 pontuações separadas. Estes testes são influenciados pelo nível de escolaridade do doente.

Utilizou-se o teste Mini Mental Status Examination (MMSE) questionário cuja pontuação máxima é de 30 pontos, usado para rastrear défice cognitivo (126). Avalia cinco domínios: orientação temporo-espacial, atenção, memória, linguagem e capacidade visuo-construtiva. Os pontos de corte para a população portuguesa utilizados foram: 22 para 0-2 anos de literacia, 24 para 3-6 anos de literacia e 27 para literacia superior a 7 anos.

São ainda aplicadas duas escalas de avaliação de depressão: a escala de Hamilton (127) e o “inventário de depressão de Beck” (128). A escala de Hamilton consta de um conjunto de perguntas utilizadas para detectar e identificar a intensidade e gravidade de sinais e sintomas depressivos. Consta

de 21 itens que cobrem sintomas emocionais, sintomas de culpabilidade, pensamentos suicidas e perturbações somáticas como alterações do sono e do peso. É uma escala para ser aplicada pelo clínico, apresentando uma pontuação máxima de 53 pontos.

O inventário de depressão de Beck é uma escala desenhada em 1961, que consta de um questionário de auto resposta com 21 itens graduados de 0 a 3, utilizado como variável contínua ou menos frequentemente utilizado como corte dicotómico. Estas duas escalas são usadas para a avaliação da depressão, e foram aplicadas nos indivíduos doentes e nos indivíduos assintomáticos que realizaram voluntariamente o teste preditivo, ignorando a sua condição de serem ou não portadores da mutação patogénica.

## II.1.2. Tratamento estatístico dos dados recolhidos

### II.1.2.1. Análise estatística

Foram calculadas as variações absolutas entre a primeira e segunda consulta para todos os casos em que estavam disponíveis os respectivos valores, baseando-se a análise dos objectivos do estudo – isto é, da deterioração – no valor de variação absoluta das componentes cognitiva, comportamental e motora da escala UHDRS.

### II.1.2.2. Análise descritiva

As variáveis contínuas foram descritas nos seus valores mínimos, médios, medianos, máximos e desvio padrão.

Relativamente às variáveis categóricas são apresentadas as suas frequências relativas.

### II.1.2.3. Análise comparativa

As análises comparativas entre pares de variáveis contínuas foram feitas com recurso ao ajustamento ao cálculo de Correlações de Pearson. Estas correlações foram assim classificadas:

38

Correlação	p (em valor absoluto)
Não significativa	$< 0.3$
Fraca	$\geq 0.3$ e $< 0.5$
Moderada	$\geq 0.5$ e $< 0.8$
Forte	$\geq 0.8$

No caso particular da avaliação da relação entre o número de repetições CAG e a idade de aparecimento do primeiro sintoma, foi também ajustado um modelo de regressão linear. Nas restantes comparações foram empregues o Teste do Qui-quadrado de Pearson, o Teste t de Student para amostras emparelhadas e os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e de Friedman, sendo indicado na apresentação dos resultados, ao longo do texto, qual o teste utilizado em cada caso.

### II.1.2.4. Análise de sobrevivência

Foi calculado o tempo de sobrevivência de cada doente estudado como a diferença em dias entre a data da primeira consulta e o dia 31 de Dezembro de 2010 ou, para os indivíduos com óbito registado, a data de morte. Este tempo de sobrevivência foi então estudado através de uma análise de Kaplan-Meier.

### II.1.2.5. Nível de significância

Foi utilizado um nível de significância de 95%, considerando como estatisticamente significativos os testes com valores de p inferiores a 0.05.

### II.1.3. Valores omissos

Nas datas para as quais estava disponível apenas o ano assumiu-se como data exacta o dia 1 de Julho do ano indicado. Nas datas em que o dia é omissos assumiu-se como data exacta o dia 15 do mês indicado.

Não foi realizada qualquer outra substituição de valores omissos.

#### II.1.4. Software

Todas as análises foram realizadas com recurso ao software R 2.12.1.

### II.2. Metodologia utilizada na avaliação da Qualidade de Vida em doentes com Doença de Huntington

39

A Qualidade de Vida foi avaliada em 23 doentes observados de forma consecutiva na consulta, encontrando-se em diversos estadios de doença. Todos apresentavam um diagnóstico de DH confirmado por estudo genético. Foram avaliados de acordo com o protocolo do estudo, e aplicado o questionário SF-36 como instrumento de avaliação da qualidade de vida. O SF-36 é um questionário genérico, auto-administrado, constituído por 36 itens. Apresenta 8 subdimensões: função física (FF), desempenho físico (DF), dor física (DR), saúde em geral (SG), vitalidade (VT), função social (FS), desempenho emocional (DE) e saúde mental (SM). As referidas subdimensões podem agrupar-se em 2 dimensões gerais de estado de saúde: física (FF, DF, DR e SG) e mental (VT, FS, DE e SM) (120). Cada subdimensão é cotada de 0 a 100, em que 0 indica problemas extremos e 100 indica ausência de problemas. A bateria SF-36 é recomendada como instrumento de escolha para avaliar qualidade de vida em doentes com DH depois de comparada com o *Sickness Impact Profile*, de acordo com Ho e colaboradores (129).

#### II.2.1. Análise estatística do estudo sobre Qualidade de Vida

A análise estatística do estudo foi realizada utilizando o *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* para Windows, versão 17.0 (*SPSS Inc, Chicago, IL, USA*). As características dos doentes e resultados são descritos como média  $\pm$  desvio-padrão. Calculou-se o coeficiente de *Spearman* e a regressão *Partial Least Square* para avaliar a relação entre UHDRS e SF-36. Construíram-se 2 gráficos: o primeiro mostra a comparação entre a amostra e a população portuguesa sem doença (130), e o segundo mostra a comparação da amostra com um estudo de referência realizado em doentes com DH por Ho e colaboradores (129, 130). O valor de significância estatística foi considerado como  $p < 0.05$ .

### II.3. Metodologia utilizada no estudo da disfunção bioenergética nos híbridos de doentes com Doença de Huntington

#### II.3.1. Materiais

40

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: *Opti-MEM* e *RPMI-1640*. O meio de cultura *Opti-MEM* foi adquirido à GIBCO (Paisley UK). O meio *RPMI-1640*, o inibidor da protease (quimostatina, pepstatina A, leupeptina e antipaina), o ácido 3-Nitropropiónico (3-NP), a penicilina/estreptomicina, o dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD), a tiamina pirofosfato (TPP), a coenzima A com grupo funcional sulfidrilo (CoASH), o piruvato de sódio, o malato, a citrato sintase de coração de porco, a acetil-CoA, o fosfato do dinucleótido de nicotinamida e adenine (NADP), a glucose 6-fosfato e a maleimida foram adquiridos à *Sigma Chemical Co.* (St Louis, MO, USA). Todos os outros reagentes foram de preparação analítica.

#### II.3.2. Produção de híbridos, cultura e incubação com 3-NP

Os híbridos (*cytoplasmic hybrid systems* - Cyb) foram obtidos através da fusão de células humanas de teratocarcinomas (células rho0 NT2, depletadas de DNA mitocondrial, adquiridas através de R. H. Swerdlow, da Universidade de Virginia, Charlottesville, VA, USA), com plaquetas isoladas de seis doentes com DH confirmada geneticamente (CAG entre 42 e 44), pertencentes às famílias do estudo, e de três controlos (CTL) emparelhados para a mesma idade sem qualquer doença neurológica. O método foi previamente descrito por Ferreira e colaboradores em 2010 (131).

A cultura dos híbridos foi realizada em meio *Opti-MEM* enriquecido com 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) e mantido a 37°C em incubação em meio humedecido contendo 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>. As experiências foram realizadas nos híbridos após dois meses de cultura, tal como previamente descrito (131). Nas experiências cujo objectivo foi a inibição da glicólise, o meio de cultura utilizado, *Opti-MEM*, foi substituído pelo meio *RPMI* com e sem glucose. Realizaram-se também experiências adicionando 2 µg/ml de oligomicina ao meio com ou sem glucose, com o objectivo de inibir a síntese mitocondrial de ATP. Noutro conjunto de experiências adicionou-se ao *RPMI* sem glucose, um suplemento de 2 mM de 2-desoxy-Dglucose (+2-DOG), um inibidor competitivo do metabolismo da glucose (132), mantendo-se as células neste meio durante as 8 horas que precederam as experiências. Posteriormente, para avaliar a importância do metabolismo glicolítico, realizaram-se experiências enriquecendo o meio *RPMI* sem glucose e com 2-DOG, com 10 mM de piruvato (2-DOG +Pir), a fim de estimular directamente a mitocôndria.

Os híbridos foram colocados em câmaras ou frascos, em concentração celular de  $0.06 \times 10^6$  células /cm<sup>2</sup>, no dia anterior à experiência, de forma a permitir a confluência desejada. As células foram ainda incubadas em meios de cultura com ou sem 3-NP (0.1, 1 ou 10 mM) durante 24 horas, ou na presença ou ausência de inibidores metabólicos durante um período de 8 horas, tal como está referido nas legendas das figuras onde os resultados são apresentados.

### II.3.3. Quantificação do ATP e Fosfocreatina

O ATP foi quantificado em extractos celulares preparados de acordo com a metodologia descrita por Ferreira e colaboradores (133). A quantificação foi feita por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) com detecção a 254 nm, tal como previamente descrito por Stocchi (134). Nesta amostra não foram detectáveis concentrações de ADP e AMP. A identificação do pico foi determinada através do tempo de retenção comparado com o padrão e a quantidade de ATP avaliada usando uma curva padrão.

As mesmas amostras foram usadas para determinar os níveis intracelulares de fosfocreatina, acompanhando a redução do NADP<sup>+</sup> a 340 nm, de acordo com o método previamente descrito por Heinz and Weißer em 1985 (135). Apresentam-se os resultados em pmol de fosfocreatina ou ATP por miligrama de proteína convertidos em percentagem dos controlos.

### II.3.4. Determinação do piruvato e lactato intracelular

A preparação das células e a determinação do lactato e piruvato foi feita de acordo com o método descrito por Ferreira e colaboradores (133). Os resultados do conteúdo em lactato e piruvato são apresentados em pmol/mg de proteína e são expressos na razão lactato / piruvato.

### II.3.5. Quantificação da relação NADH/NAD total mitocondrial

A fracção mitocondrial foi obtida por centrifugação de acordo com o método descrito por Ferreira e colaboradores (133) e a quantificação da proteína feita utilizando o método de Bradford, sendo os resultados normalizados em pmol/ por mg proteína e apresentados através da razão NADH/NAD.

### II.3.6. Actividade das enzimas do ciclo tricarboxílico

As actividades da piruvato, alfa-cetoglutarato e malato desidrogenase foram medidas de acordo com o método previamente descrito por Zhou em 2008 (136). A actividade enzimática foi determinada por espectrofotometria, seguindo a velocidade de formação do NADH a 340nm, tal como descrito por Ferreira e colaboradores (133) e os resultados apresentados em unidades de absorvância por minuto por miligrama de proteína.

42

### II.3.7. Determinação da actividade da glicose-6-fosfato desidrogenase

A actividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) foi determinada de acordo com o método descrito por Choo em 2005 (137). A produção de NADPH foi monitorizada de forma contínua a 340 nm e a actividade calculada em unidades de absorvância por minuto por miligrama de proteína.

### II.3.8. Determinação das concentrações de aspartato, glutamato, glutamina e alanina

Os níveis mitocondriais dos aminoácidos aspartato, glutamato, glutamina e alanina, foram quantificados nas fracções mitocondriais separadas de acordo com a metodologia descrita por Ferreira e colaboradores (133). Estes aminoácidos foram detectados como derivados fluorescentes após derivatização com o-ftaldeído/2-mercaptoetanol (OPA/MCE). As concentrações dos aminoácidos foram determinadas comparando com os picos de aminoácidos padrão, e expressas em nanomol por mg de proteína tal como descrito por Ferreira e colaboradores (133).

#### Análise estatística

Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão do número de experiências indicadas nas legendas das respectivas Figuras onde estão apresentados. A comparação entre múltiplos grupos foi realizada com a análise de variância (ANOVA), seguida do teste Bonferroni para comparação entre grupos experimentais. O Teste t de Student também foi realizado quando da comparação entre duas populações Gaussianas. Considerou-se significância para  $p < 0.05$ .

# CAPÍTULO III

## RESULTADOS

Trata-se de um estudo prospectivo observacional, longitudinal (dados colhidos nos doentes em dois momentos distanciados de 12 meses) e transversal dos doentes e dos indivíduos em risco para a doença que realizaram um teste preditivo ignorando a sua condição de portadores ou não da mutação patogénica.

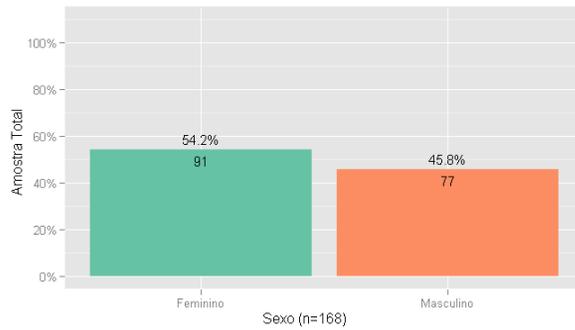
### III.1. Caracterização dos doentes

#### III.1.1. Dados sociodemográficos

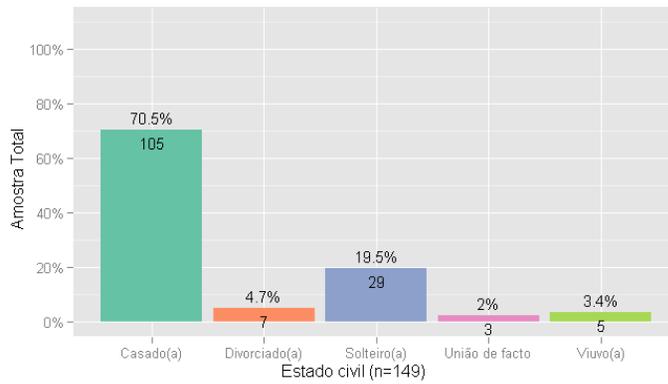
Foram observados 185 doentes e seus familiares relativos em primeiro grau, isto é, que partilham 50 % dos seus genes ou distam entre si uma meiose. Têm avaliação com seguimento de pelo menos um ano 168 indivíduos, e é este o número da amostra aqui tratada.

Em 16 doentes o diagnóstico de DH não foi confirmado apesar de clinicamente reunirem critérios que o sugeriam. Viriam a demonstrar outras patologias nas quais a existência de coreia ou outros sinais motores apontavam inicialmente para aquele diagnóstico.

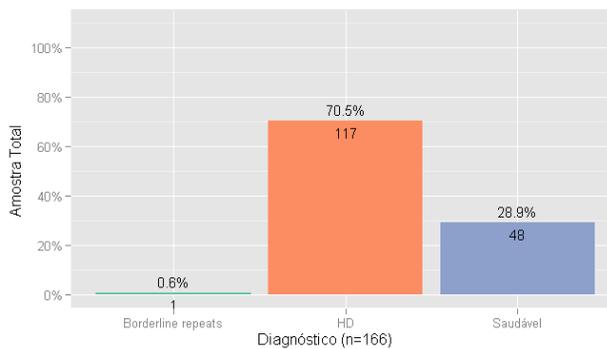
Nesta população apenas três indivíduos são de origem africana (1.8 %) sendo os restantes caucasóides. A distribuição é relativamente homogénea, verificando-se um ligeiro predomínio do sexo feminino com 91 elementos (54.2%) para 77 do sexo masculino (45.8 %) como se vê na Figura 1. A idade média dos indivíduos é de  $49.6 \pm 16.7$ , sendo na maioria casados (70.5%). A distribuição por estado civil mostra-se na Figura 2. A doença é clinicamente manifesta em 94 doentes. Em risco para a desenvolver foram observados 74 indivíduos, dos quais 48 tiveram um teste negativo e 26 viram confirmada a mutação depois de realizado o teste genético preditivo (Figura 3).



**Figura 1: Distribuição dos indivíduos por sexo.** Dos 168 indivíduos 91 são do sexo feminino e 77 do sexo masculino.



**Figura 2: Estado civil da população global.** Verifica-se que 70.5% dos indivíduos são casados e 19.5% são solteiros.



**Figura 3: Distribuição por tipo de diagnóstico:** 94 doentes e 74 indivíduos em risco (sendo o teste preditivo positivo em 26 e negativo em 48 indivíduos).

## III.1.2. População total

Em relação à sua proveniência a população distribui-se um pouco por todo o país com maior número de doentes do distrito de Coimbra, traduzindo apenas a zona de influência do Hospital (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição Geográfica da população do estudo

Distrito	Frequência	Percentagem Válida	Percentagem Cumulativa
Aveiro	23	13,7	23,2
Beja	2	1,2	24,4
Castelo Branco	4	2,4	26,8
Coimbra	75	44,6	71,4
Guarda	12	7,1	78,6
Leiria	8	4,8	83,3
Lisboa	3	1,8	85,1
Porto	1	6	85,7
Santarém	12	7,1	92,9
Setúbal	1	,6	93,5
Viseu	11	6,5	100,0
Total	168	100,0	

Na população referida não se encontrou nenhuma particular distribuição geográfica para além de alguns nichos correspondentes a aglomerados de famílias em que é possível encontrar um fundador comum. Assim, encontramos um nicho perto de Coimbra (S. Frutuoso) com cerca de 18 elementos pertencentes a três famílias que apresentam ligação entre si, outro com 8 elementos em Oliveira de Azeméis e um terceiro com 7 elementos em Seia. Os restantes casos têm origem um pouco dispersa por toda a região centro do país. A maioria dos doentes desta amostra é natural do distrito de Coimbra (44.6 %).

As diversas classes profissionais desta população estão representadas na Tabela 2. Cerca de quarenta indivíduos não têm profissão constante e 8 foram reformados ou perderam o emprego por questões relacionadas com a doença.

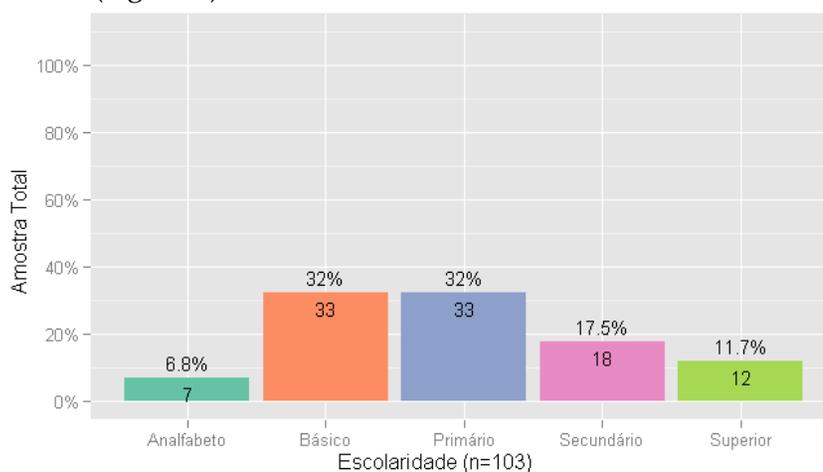
**Tabela 2: Distribuição dos doentes por classes profissionais**

46

	N	%
Operadores Inst. Industriais, Condutores, Montadores	20	16.5
Trabalhadores Não Qualif. da Agric., Indúst., Comérc., Serv.	20	16.5
Profissões Intelectuais e Científicas	17	14.0
Pessoal Serv. Protecção, Segurança, Pessoais, Domésticos	16	13.2
Empregados Administrativos	13	10.7
Trabalhadores da Agricultura e Pesca	7	5.8
Trabalhadores de Produção Industrial e Artesãos	6	5.0
Reformados	5	4.1
Desempregados	3	2.5
Profissões Técnicas Intermédias	3	2.5
Corpos Legislativos, Quadros Dirigentes FP e Empresas	2	1.7
<b>Total</b>	<b>121</b>	

### III.1.3. Escolaridade

Em relação ao número de anos de escolaridade, 64% tem entre quatro e nove anos, 6.8% não tem qualquer alfabetização não tendo sequer frequentado a escola, 17.5% frequentou o secundário e apenas 11.7% tem acima de 12 anos de escolaridade (Figura 4).



**Figura 4: Distribuição dos indivíduos por nível de escolaridade.** Verifica-se que existem 6.8% de analfabetos e 64% têm entre 4 e 6 anos de alfabetização. Cerca de 12% frequentou um curso superior.

### III.1.4. Patologias associadas

A existência de comorbilidades está exposta na Tabela 3, sendo a patologia respiratória (33%) e a hipertensão arterial (18.2%) as que se associam com maior frequência. A diabetes tipo 1 está presente em 6.1 % dos indivíduos, os quais fazem terapêutica específica. Só em 33 dos 94 doentes existem comorbilidades assinaláveis.

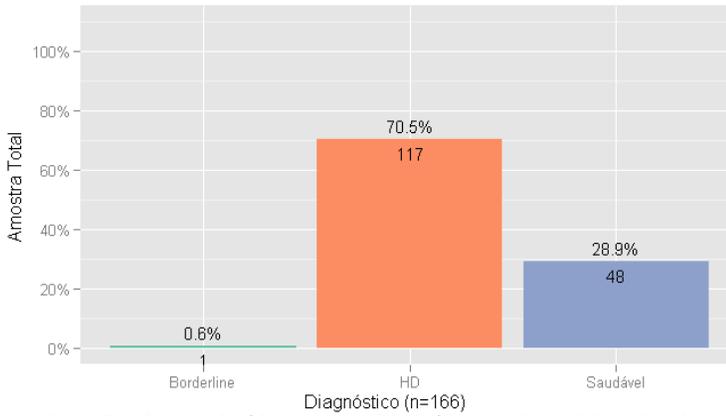
**Tabela 3: Prevalência de outras patologias**

	N	%
Respiratória	11	33.3
Vascular	6	18.2
Alcoolismo	4	12.1
Gástrica	3	9.1
Genito-urinária	3	9.1
Ocular	3	9.1
Diabetes	2	6.1
Outras	1	3.0
Total	33	

### III.2. Caracterização da Doença

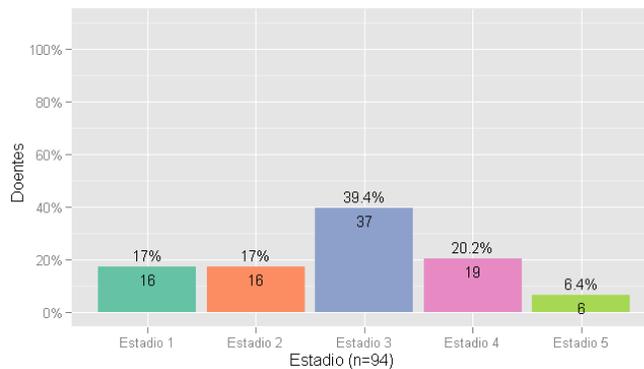
O diagnóstico clínico foi confirmado em quase todos os doentes por teste genético molecular (97%); em 3% o teste não foi efectuado por se tratar de doentes em estadió avançado com longo período de *follow-up* tendo sido considerada desnecessária a sua realização.

Assim, o resultado do diagnóstico molecular veio confirmar a doença em 71% de indivíduos, quer num estadió pré-sintomático quer já em fase de doença. Apresenta-se o diagnóstico final na Figura 5, onde está representada a amostra do estudo de acordo com o resultado do teste molecular, com 120 indivíduos com DH (71 %), isto é portadores de um alelo expandido contendo um número de repetições do nucleótido CAG igual ou superior a 36. Em 29 % de indivíduos a mutação não se confirmou sendo por isso saudáveis. Um caso foi considerado *borderline* porque apresenta um alelo normal de grande tamanho, dito alelo intermédio, com 28 repetições CAG (reconhecidamente instável podendo originar novas mutações).



**Figura 5: Distribuição dos indivíduos por diagnóstico.** Em 120 indivíduos a mutação foi confirmada, sendo 94 doentes e 26 portadores assintomáticos (70.5% da amostra). Em 48 indivíduos a mutação não se confirmou sendo por isso saudáveis (29% da amostra).

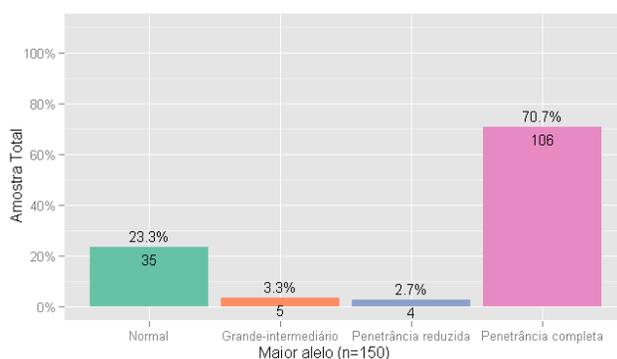
Aplicadas as escalas de funcionalidade à população doente, verifica-se que os 94 doentes se distribuem pelos cinco estádios de gravidade da doença. De acordo com a escala de *Shoulson e Fahn*, só 17% se encontram no estadio 1, isto é com total capacidade para o exercício da sua profissão, gerir finanças, realizar sem apoio as actividades da vida diária. Outros 17% estão no estadio 2 o que denota redução na normal actividade profissional e discreta limitação na gestão financeira, estando preservada a independência nas actividades da vida diária. Verifica-se que mais de 60% dos doentes estão no estadio 3 e 4, traduzindo incapacidade no exercício regular da profissão, necessidade de apoio na gestão financeira e o início da perda de independência e autonomia para as tarefas de sobrevivência (alimentação, higiene). No estadio 5, severamente incapacitados com dependência em todas as actividades da vida diária, encontram-se 6.4% dos doentes. Todos os doentes no estadio 5 e cerca de metade dos que se encontram no estadio 4 estão institucionalizados, necessitando de apoio em todas as tarefas da vida diária. A distribuição por estádios encontra-se representada na Figura 6.



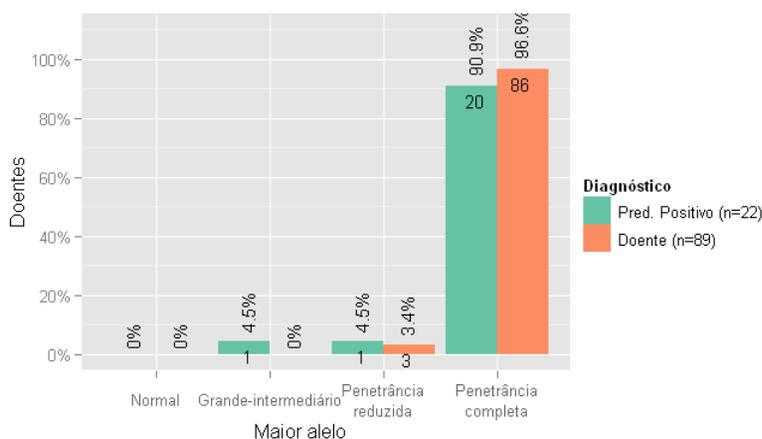
**Figura 6: Distribuição dos doentes por estadio de funcionalidade, de acordo com a escala de *Shoulson e Fahn*.** Cerca de 60% encontram-se nos estádios 3 e 4, o que significa que se encontram mediana a moderadamente incapacitados para as actividades da vida diária e com moderada a marcada incapacidade de gestão de tarefas domésticas.

### III. 3. Diagnóstico genético

Na Figura 7 apresentamos a distribuição de repetições CAG no maior alelo após realização de teste genético. Assim, e considerando o tamanho do alelo expandido, classificamos os alelos em classe 1, alelos normais contendo até 26 repetições CAG, classe 2, alelos normais grandes contendo entre 27 e 35 repetições CAG, classe 3, entre 36 – 39 repetições, estes de penetrância incompleta, e por último alelos de classe 4, de penetrância completa, com um número de repetições CAG superior a 40. Verifica-se que 3.4 % de doentes e 4.5 % de indivíduos preditivos positivos têm um alelo classe 3, isto é um alelo de penetrância reduzida, com um número de repetições CAG entre 36 e 39, todos os restantes têm alelos de penetrância completa (Figura 8). Existem cinco indivíduos que possuem um alelo grande, normal, classe 2 com 28 repetições.



**Figura 7: Classificação dos alelos de acordo com o número de repetições CAG em toda a população do estudo.** Alelos normais até 26 repetições CAG, alelos normais grandes entre 27 e 35 repetições CAG, alelos expandidos de penetrância reduzida entre 36-39, e de penetrância completa acima de 40 repetições CAG.

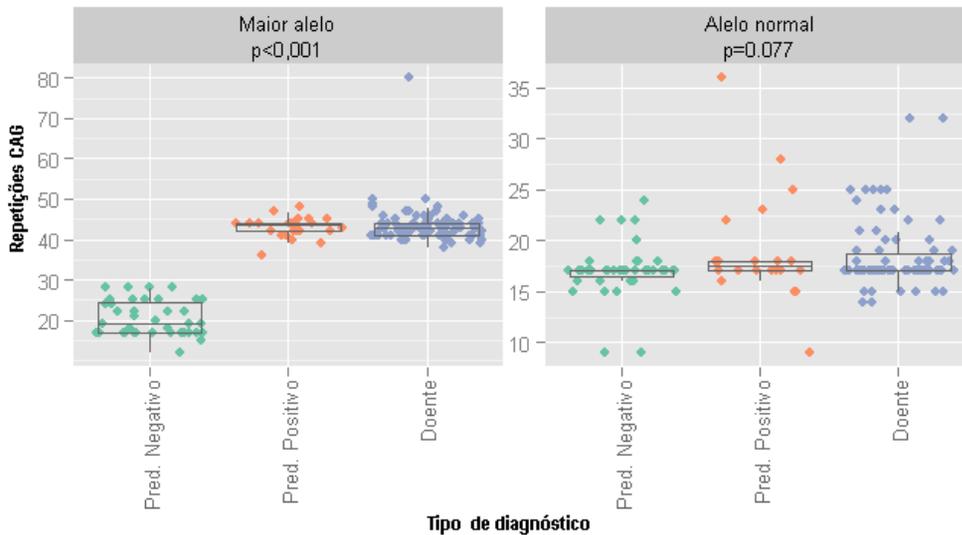


**Figura 8: Distribuição dos indivíduos doentes e preditivos positivos de acordo com o tamanho do alelo expandido.** Alelos de classe 2 normais de grande tamanho existem em 4.5% dos 22 preditivos positivos, alelos classe 3 expandidos de penetrância incompleta existem em 3.4 dos doentes e 4.5 dos indivíduos preditivos positivos, e alelos de penetrância completa existem em 96.6% dos doentes e 90.9% dos indivíduos preditivos positivos.

Nos doentes o tamanho do alelo expandido encontra-se entre 38 e 80 repetições CAG (média  $43.5 \pm 4.6$ ). O alelo normal tem entre 14 e 32 repetições (média  $18.4 \pm 3.4$ ). Dos indivíduos assintomáticos que efectuaram um teste preditivo, 26 possuem um alelo expandido cujo número de repetições se localiza entre 36 e 48 (média  $42,9 \pm 2.6$ ) sendo pois portadores da mutação patogénica. Em 48 indivíduos em risco a doença terá sido definitivamente afastada, apresentando alelos de tamanho normal, o maior entre 12-28 e o menor alelo entre 9-24 repetições CAG.

Obviamente, no que diz respeito ao número de repetições CAG, observa-se a existência de diferenças significativas entre os três grupos (Teste de Kruskal-Wallis:  $p < 0.001$ ) com os indivíduos com diagnóstico preditivo negativo a apresentarem valores bastante inferiores aos dos outros dois grupos que apresentam distribuições de valores aproximadas (Figura 9 e Tabelas 4 e 5). Não se registam diferenças relativamente ao tamanho do alelo normal.

Comparando o número de repetições CAG entre os indivíduos doentes e os indivíduos que fizeram o teste preditivo e são positivos, não se registam diferenças significativas entre os dois grupos. Ao compararmos os indivíduos preditivos negativos com os preditivos positivos, observa-se a esperada diferença na expansão do alelo com a mutação que confere a doença, não existindo qualquer diferença no tamanho do alelo normal (Figura 10).



**Figura 9: Comparação do número de repetições CAG por tipo de diagnóstico.** Verifica-se não existir diferença entre o número de repetições CAG nos indivíduos que realizaram o teste preditivo e este foi positivo e o número de repetições CAG nos indivíduos doentes.

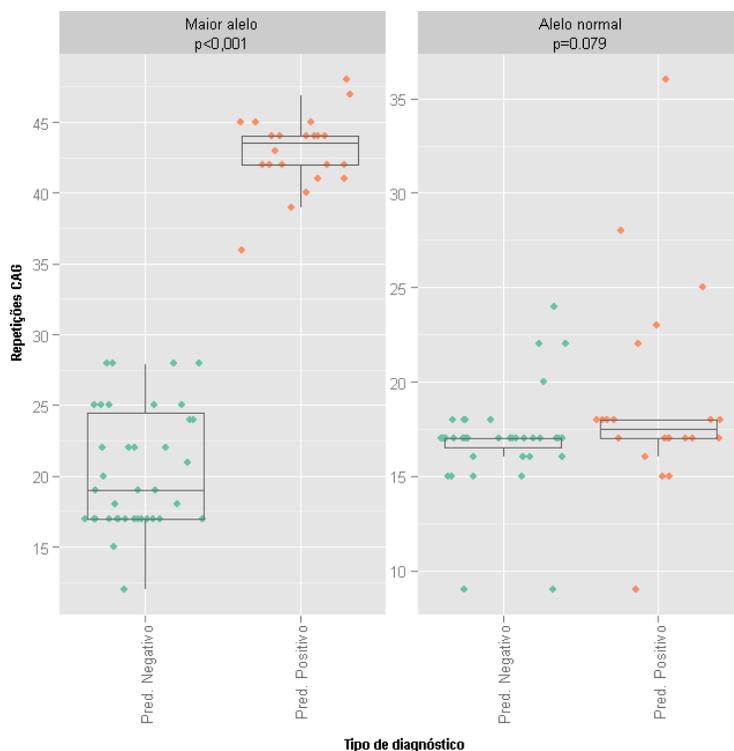
Tabela 4 e 5: Número de repetições CAG por tipo de diagnóstico

	Diagnóstico: Pred. Negativo	Maior Alelo Diagnóstico: Pred. Positivo	Diagnóstico: Doente
Mín.	12.0	36.0	38.0
Mediana	19.0	43.5	43.0
Média	20.4	42.9	43.5
Máx.	28.0	48.0	80.0
Desv. Pad.	4.2	2.6	4.6
p-value		<0.001	

	Diagnóstico: Pred. Negativo	Alelo Normal Diagnóstico: Pred. Positivo	Diagnóstico: Doente
Mín.	9.0	9.0	14.0
Mediana	17.0	17.5	17.0
Média	17.0	18.9	18.4
Máx.	24.0	36.0	32.0
Desv. Pad.	2.7	3.6	3.2
p-value		0.077	

Verifica-se que o valor médio da expansão CAG é de 43.5 repetições nos indivíduos doentes e de 42.9 repetições CAG nos indivíduos preditivos positivos, não existindo diferença significativa entre estes dois grupos. O alelo não expandido tem um valor médio de 17 CAG para os indivíduos preditivos negativos, 18.9 para os indivíduos preditivos positivos, e 18.4 para os indivíduos doentes, não existindo diferença entre os 3 grupos.

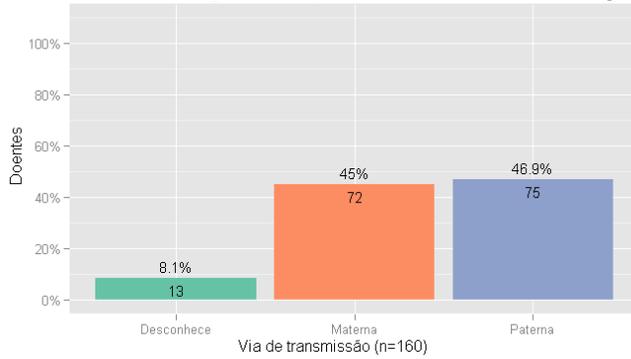


**Figura 10: Número de repetições CAG nos indivíduos preditivos negativos e preditivos positivos.** O tamanho do alelo normal não diverge nos dois grupos, preditivos positivos e preditivos negativos.

III.3.1. Forma de Transmissão

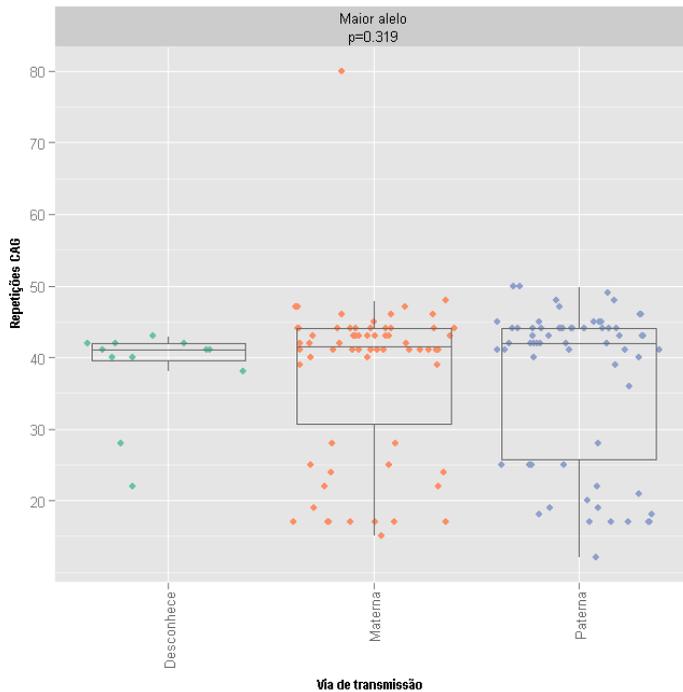
Em 76 indivíduos a transmissão foi por via paterna (46.9%) e em 74 materna (45%). Em 13 indivíduos (8.1%) não foi possível determinar a via de transmissão apesar de conhecidos os progenitores. Nesta amostra não se registam diferenças significativas entre transmissão paterna ou materna (teste de Qui-quadrado de Pearson:  $p=0.823$ ) como se mostra na Figura 11.

52



**Figura 11: Distribuição dos indivíduos doentes e preditivos positivos de acordo com a via de transmissão da expansão de repetições CAG.** Em 46% a transmissão foi paterna, em 45% materna e em 8% não foi possível determiná-la.

Do mesmo modo não se observam diferenças no que respeita ao tamanho da expansão do trinucleótido CAG e a via de transmissão (teste de Kruskal-Wallis), como está representado na Figura 12.



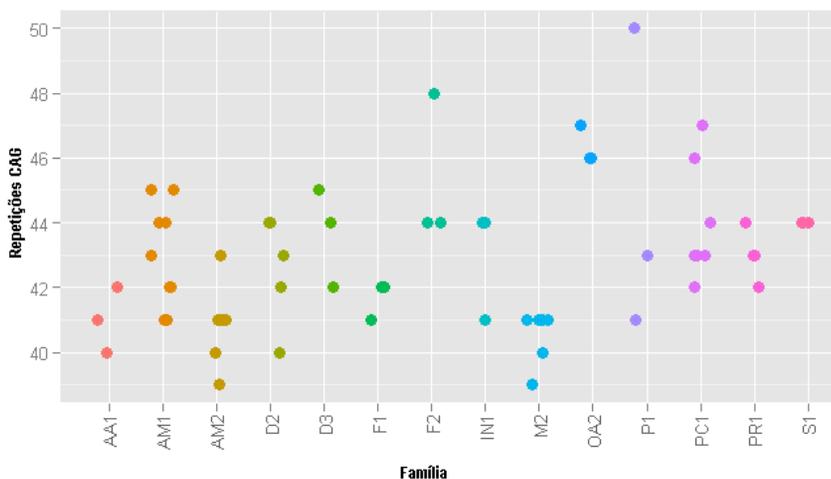
**Figura 12: Número de repetições CAG de acordo com a via de transmissão.** Verifica-se não existir diferença quanto ao tamanho de expansão CAG e a herança materna ou paterna.

Na pesquisa de uma eventual uniformidade no número de repetições CAG no maior alelo entre membros da mesma família, procedeu-se à análise comparativa dentro das famílias para as quais estavam disponíveis pelo menos 3 contagens de repetições CAG (Tabela 6 e Figura 13). A existência de diferenças significativas entre famílias (Teste de Kruskal-Wallis:  $p=0.001$ ) pode ser interpretada como a indicação de que a distribuição do número de repetições CAG dentro de cada família não é aleatória, podendo por isso dizer-se que há uma componente familiar significativa no número de repetições apresentado por cada doente. No entanto, o número relativamente reduzido de elementos analisados em cada família (frequentemente apenas três) e a relativa variabilidade encontrada mesmo dentro de cada família obrigam a alguma prudência na interpretação destes resultados.

**Tabela 6: Número de repetições CAG no alelo expandido, por família.** Referente a 14 famílias onde existem pelo menos 3 indivíduos afectados. As famílias estão codificadas pelas iniciais do nome de família

	Repetições CAG													
	AA1	AM1	AM2	D2	D3	F1	F2	N1	M2	OA2	P1	PC1	PR1	S1
Mín.	40.0	41.0	39.0	40.0	42.0	41.0	44.0	41.0	39.0	46.0	41.0	42.0	42.0	44.0
Mediana	41.0	43.0	41.0	43.0	44.0	42.0	44.0	44.0	41.0	46.0	43.0	43.0	43.0	44.0
Média	41.0	43.0	40.8	42.6	43.7	41.7	46.3	43.0	40.5	46.3	44.7	44.0	43.0	44.0
Máx.	42.0	45.0	43.0	44.0	45.0	42.0	48.0	44.0	41.0	47.0	50.0	47.0	44.0	44.0
Desv. Pad.	1.0	1.6	1.3	1.7	1.5	0.6	2.3	1.7	0.8	0.6	4.7	1.8	0.8	0.0
p-value	0.001													

Verifica-se que, em relação ao progenitor, a maior expansão ocorre na família P1, em que o pai com 41 repetições originou um descendente com 50 repetições CAG. Nas restantes famílias a expansão não excedeu as 4 repetições e em nenhuma situação se verificou a contracção do alelo.



**Figura 13: Distribuição do número de repetições CAG no maior alelo por famílias, codificadas pelas iniciais do nome de família.**

**III.4. Caracterização da população total**

A idade aquando da primeira consulta é significativamente diferente ( $p < 0.001$ ) entre tipos de diagnóstico, com os indivíduos preditivos positivos a apresentarem a idade média mais baixa (31 anos), seguindo-se-lhes os indivíduos preditivos negativos (39 anos) e os indivíduos com diagnóstico de DH (53 anos). Esse resultado é apresentado na Tabela 7.

54

**Tabela 7: Idade média na primeira consulta.** Os indivíduos preditivos positivos apresentam uma idade média na 1ª consulta significativamente mais baixa em relação aos outros dois grupos

	Idade (anos)		
	Diag: Pred. Negativo	Diag: Pred. Positivo	Diag: Doente
Mín.	19.0	18.0	17.0
Mediana	37.0	29.5	53.0
Média	38.8	31.4	53.3
Máx.	62.0	49.0	86.0
Desv. Padrão	13.9	9.4	14.7
p-value	<0.001		

**III.4.1. Idade do primeiro sintoma**

Os primeiros sintomas surgem em média por volta dos 45 anos nos indivíduos com diagnóstico de DH, o que se mostra na Tabela 8. De esclarecer que se considera o início da doença quando surgem inequívocos sinais motores, e que originem um *score* na UHDRS/componente motora superior a 4 pontos. Verificamos que, nesta amostra, a idade de início variou entre os 18 e os 81 anos, o que se mostra na Tabela 8.

Tabela 8: Idade de aparecimento do primeiro sintoma nos indivíduos doentes

Idade (anos)	
	Doente
Mín.	18.0
Mediana	40.0
Média	45.0
Máx.	81.0
Desv.Padrão	15.2
p-value	-

Considerando a idade de início inferior a 20 anos, isto é as formas juvenis de doença, existem apenas 8 indivíduos (7%), enquanto as formas tardias, com início depois dos 60 anos representam 17%, correspondendo a 16 indivíduos (Figura 14). As formas juvenis manifestam-se inicialmente por sintomas emocionais ou comportamentais, enquanto as apresentações tardias surgem sobretudo com sintomas motores.

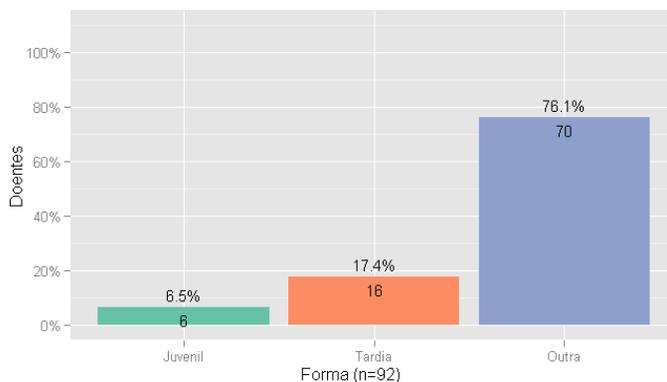


Figura 14: Frequência de apresentação das formas juvenis (início abaixo dos 20 anos) e tardias (início acima dos 60 anos).

Os indivíduos com formas juvenis de DH apresentam um número de repetições CAG significativamente superior ao dos restantes indivíduos doentes e preditivos positivos (Teste de Kruskal-Wallis:  $p=0.002$ ) como se vê na Figura 15.

Verifica-se a existência de um indivíduo com 80 repetições CAG, sendo o valor mais elevado desta amostra, correspondendo também ao indivíduo com início mais precoce de sintomatologia (cerca dos 18 anos de idade).

56

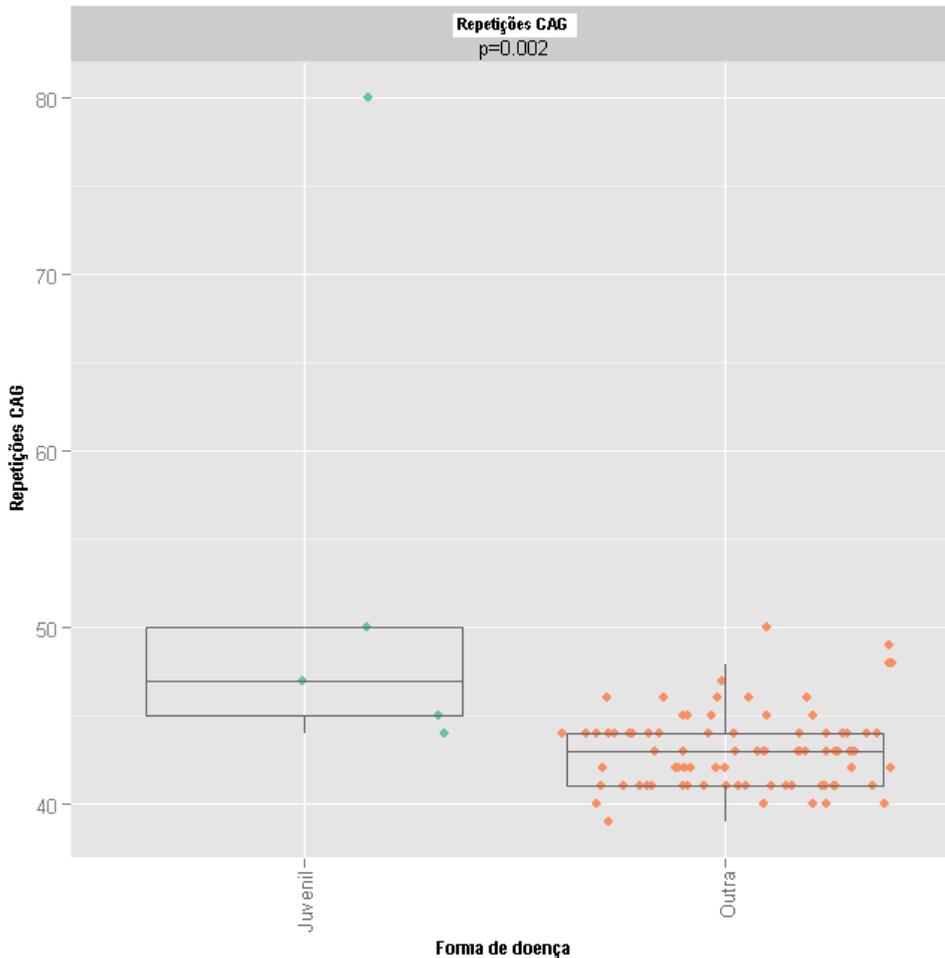
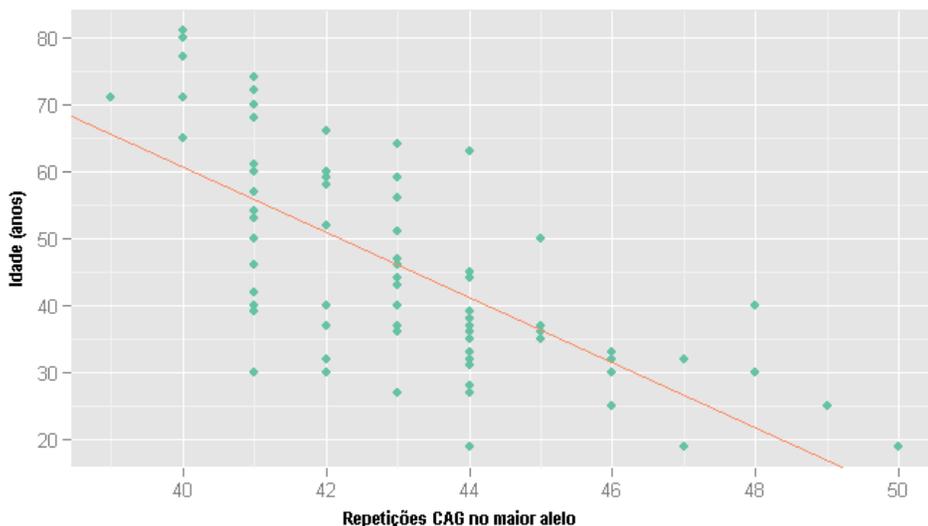


Figura 15: Comparação do número de repetições CAG entre os indivíduos com forma juvenil de DH e os restantes indivíduos doentes.

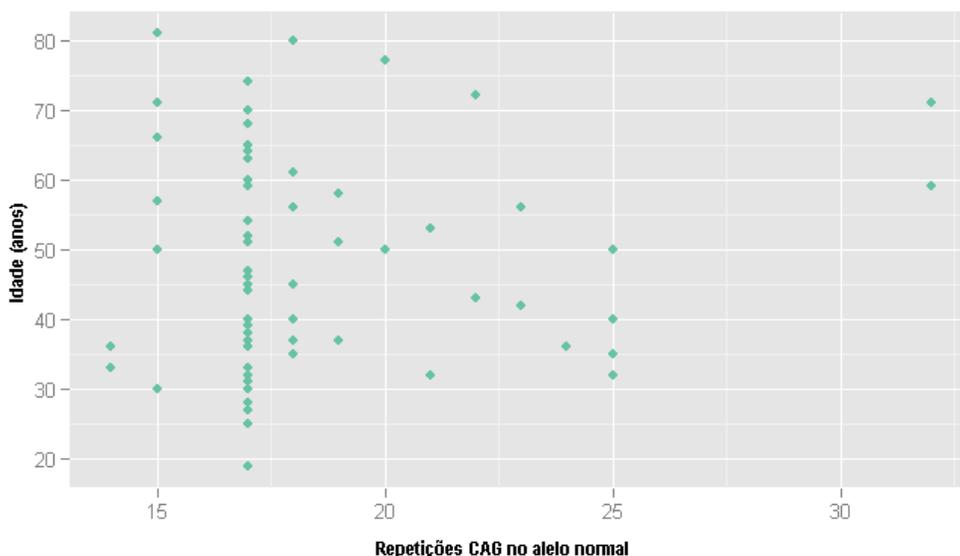
Nos indivíduos com diagnóstico confirmado de DH regista-se uma forte relação linear ( $\text{Idade} = 255.3 - 4.866 \times \text{repetições CAG}$ ,  $p < 0.001$ ,  $R^2 = 45.9\%$ ) entre o número de repetições CAG no maior alelo e a idade de aparecimento do primeiro sintoma, com o aumento do número de repetições CAG associado a mais baixa idade de aparecimento de sintomas (Figura 16).



57

**Figura 16: Idade de aparecimento do primeiro sintoma vs. repetições CAG no maior alelo nos indivíduos doentes.** Verifica-se que quanto maior o número de repetições CAG mais precoce é o início dos sintomas.

Não se observa qualquer relação entre o número de repetições CAG no alelo normal e a idade de aparecimento do primeiro sintoma (Figura 17).



**Figura 17: Idade de aparecimento do primeiro sintoma vs repetições CAG no alelo normal nos indivíduos doentes.** Verifica-se não existir relação no tamanho deste alelo e a idade de início dos sintomas.

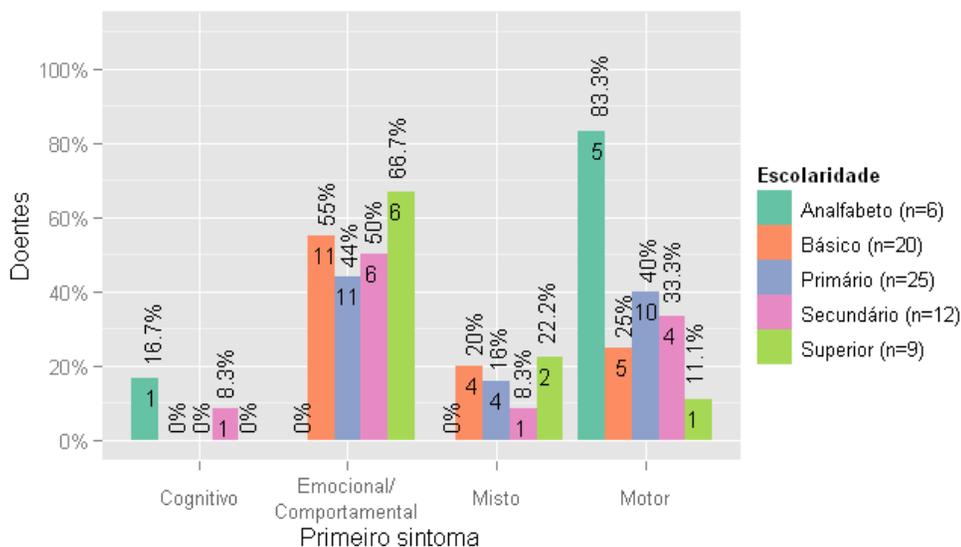
O modelo ajustado sugere, assim, que o aumento em uma unidade no número de repetições faz prever uma antecipação em cerca de 5 anos na apresentação do primeiro sintoma (correspondente ao declive da recta ajustada que é de -4.866 como indicado na respectiva equação). Registe-se, no entanto, que no modelo ajustado o número de repetições CAG no maior alelo explica apenas cerca de 46% ( $R^2$  ajustado=45.9%) da variabilidade observada na idade de aparecimento do primeiro sintoma, ainda que a relação entre as duas variáveis seja muito significativa ( $p < 0.001$ ). Dado o carácter extremo do valor, optou-se por se retirar da análise o indivíduo com número de repetições CAG igual a 80. Não se observa qualquer relação entre o número de repetições CAG no alelo normal e a idade de aparecimento do primeiro sintoma (Figura 17); a inclusão desta contagem no modelo acima apresentado traz um aumento de apenas 1.7% ao valor preditivo do mesmo.

Calculando a Correlação de Pearson entre a idade de aparecimento do primeiro sintoma e o número de repetições CAG no maior alelo, observa-se que a mesma é negativa e de intensidade moderada a forte ( $p = -0.683$ ) e muito significativa ( $p < 0.001$ ) o que vem de encontro ao observado no ajustamento do modelo linear acima referido (Tabela 9).

**Tabela 9: Correlação entre a idade de aparecimento do primeiro sintoma e o número de repetições CAG no alelo expandido nos indivíduos doentes**

	Idade (anos)	Repetições CAG
Mín.	19.0	39.0
Mediana	42.0	43.0
Média	45.6	43.1
Máx.	81.0	50.0
Desv. Padrão	15.1	2.3
p	-0.682	
p-value	<0.001	

Não se registam diferenças estatisticamente significativas no tipo de primeiro sintoma apresentado em função do nível de escolaridade (Figura 18).

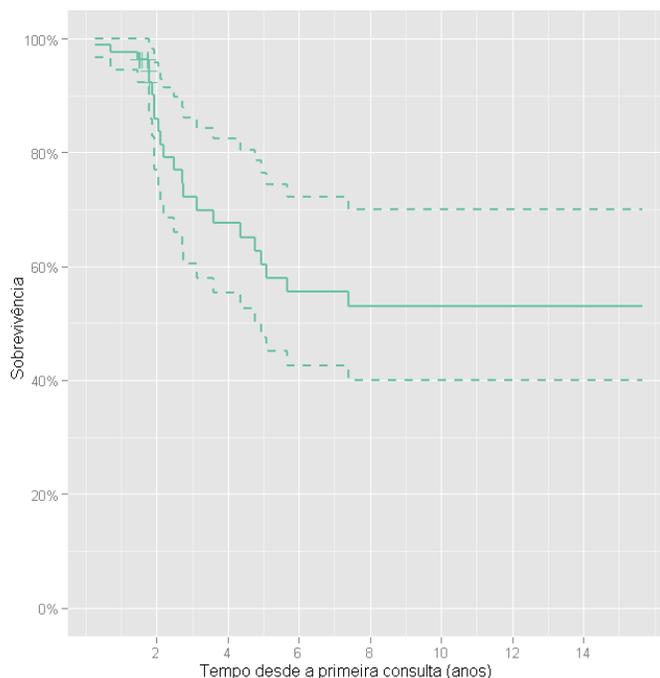


**Figura 18: Características do primeiro sintoma (motor, cognitivo ou comportamental) por nível de escolaridade.** Verifica-se que o nível de alfabetização não influencia o tipo de sintoma inicial.

#### III.4.2. Mortalidade

Ao longo deste período de observação e seguimento em consulta faleceram 28 doentes. As principais causas de morte foram infecções respiratórias, traumatismos cranianos com lesão encefálica em sequência de quedas e caquexia. Não se verificou, nesta série, nenhum suicídio. O tempo de duração de doença entre a data do diagnóstico e a morte foi de cerca de 15 anos.

Não se registaram óbitos suficientes para que pudesse ser estimado o tempo mediano de sobrevivência, tendo-se no entanto traçado a respectiva curva de Kaplan-Meier (Figura 19). A partir destes dados é possível analisar a proporção de doentes sobreviventes ao longo do tempo após a primeira consulta. Observa-se que, dois anos após a consulta inicial, a percentagem de doentes sobreviventes é de aproximadamente 84%, baixando para cerca de 60% ao fim de 5 anos.



**Figura 19: Curva de Kaplan-Meier e respectivo intervalo de confiança a 95% (tracejado) para a sobrevivência dos indivíduos doentes.** Estima-se que nos dois anos após a primeira consulta 85% dos doentes estejam vivos.

### III.4.3. Avaliação Global dos indivíduos

A avaliação global dos indivíduos doentes, em cada uma das consultas é resumida nas Tabelas 10 e 11.

Foi calculada para cada doente a variação em termos absolutos nos *scores* das várias componentes avaliadas. Essas variações foram empregues na comparação da evolução dos doentes no seu todo entre os dois momentos de avaliação, tendo-se registado diferenças significativas entre consultas nos valores das componentes motora, funcionalidade e capacidade funcional total da escala UHDRS (Teste t de Student para amostras emparelhadas:  $p=0.007$ ,  $p < 0.001$  e  $p < 0.001$ , respectivamente), bem como nos valores da escala *Mini-Mental State* (MMSE) e da escala de Beck (Teste t de Student para amostras emparelhadas:  $p=0.042$  e  $p=0.007$ , representado nas Figuras 20 a 22). Destaca-se a ausência de diferenças significativas nas capacidades comportamentais e cognitivas dos indivíduos entre as duas consultas (Teste t de Student para amostras emparelhadas:  $p=0.877$  e  $p=0.819$ ).

Tabela 10: Avaliação motora e neuropsicológica dos indivíduos doentes na 1ª Consulta

	UHDRS Motor	UHDRS Comport.	UHDRS Cognit.	UHDRS Func.	UHDRS TFC	UHDRS Indep.
Mín.	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	10.0
Mediana	31.0	17.0	133.0	21.0	12.0	90.0
Média	31.9	19.3	140.7	18.1	9.1	78.1
Máx.	116.0	52.0	349.0	25.0	13.0	100.0
Desv. Padrão	26.1	12.5	89.8	8.2	4.6	25.1

61

	MMSE	Beck	Hamilton
Mín.	0.0	0.0	0.0
Mediana	26.0	13.5	13.0
Média	22.6	13.8	12.1
Máx.	30.0	43.0	45.0
Desv. Padrão	8.4	9.5	7.3

Na Tabela 10 representa-se a média da pontuação obtida em cada escala aplicada à totalidade dos doentes na primeira observação. Verifica-se que o valor médio do *score* motor é de 31.9 pontos, o que traduz um moderado compromisso motor. Quanto à capacidade funcional, o valor médio dos *scores* apresentados nesta observação é de 18.1, sendo o total desta escala 25, pontuação que corresponde a uma funcionalidade plena. Em relação à avaliação pelo MMS verificamos que o valor médio deste teste é de 22.6 num total de 30 pontos.

Tabela 11: Avaliação motora e neuropsicológica dos indivíduos doentes na 2ª Consulta: intervalo de 12 meses

	UHDRS Motor	UHDRS Comport.	UHDRS Cognit.	UHDRS Indep.	UHDRS Func.	UHDRS TFC
Mín.	0.0	0.0	18.0	10.0	0.0	0.0
Mediana	38.0	18.0	147.0	80.0	19.5	8.0
Média	38.0	20.0	155.2	74.2	16.2	7.7
Máx.	106.0	54.0	349.0	100.0	25.0	13.0
Desv. Padrão	26.1	13.3	91.7	24.0	8.7	4.8

	MMSE	Beck	Hamilton
Mín.	0.0	0.0	0.0
Mediana	20.0	11.0	11.0
Média	19.2	12.9	11.5
Máx.	30.0	34.0	45.0
Desv. Padrão	10.2	9.8	7.9

Na Tabela 11 estão representados os valores médios da pontuação obtida em cada escala na segunda observação, distando 12 meses da primeira.

Tabela 12: Variações entre consultas: intervalo de 12 meses

	UHDRS Motor	UHDRS Comport.	UHDRS Cognit.	UHDRS TFC	UHDRS Func.	UHDRS Indep.
Mín.	-16.0	-21.0	-40.0	-9.0	-13.0	-40.0
Mediana	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Média	2.5	-0.2	-0.7	-1.1	-1.6	-2.7
Máx.	33.0	28.0	36.0	3.0	5.0	75.0
Desv. Padrão	8.6	9.1	16.3	2.1	3.1	14.4

62

	MMSE	Beck	Hamilton
Mín.	-26.0	-19.0	-15.0
Mediana	-1.0	-0.5	0.0
Média	-2.6	-1.7	-1.5
Máx.	4.0	13.0	8.0
Desv. Padrão	4.5	5.5	4.7

Na Tabela 12 representa-se a variação da pontuação em todas as escalas aplicadas com intervalo de um ano. Traduz pois a evolução da doença. Os doentes aqui avaliados (n = 86) encontravam-se num estadio 3 e 4 na primeira avaliação. Verificamos que em média, por ano, o agravamento motor é de 2.5 pontos e o MMS declina 2.6 pontos. No entanto existem variações individuais muito marcadas. Refira-se, por exemplo, a existência de um indivíduo que agravou 33 pontos na pontuação da escala motora no 2º ano de avaliação. Observamos que praticamente não existem variações nas médias das pontuações das escalas comportamentais e cognitivas.

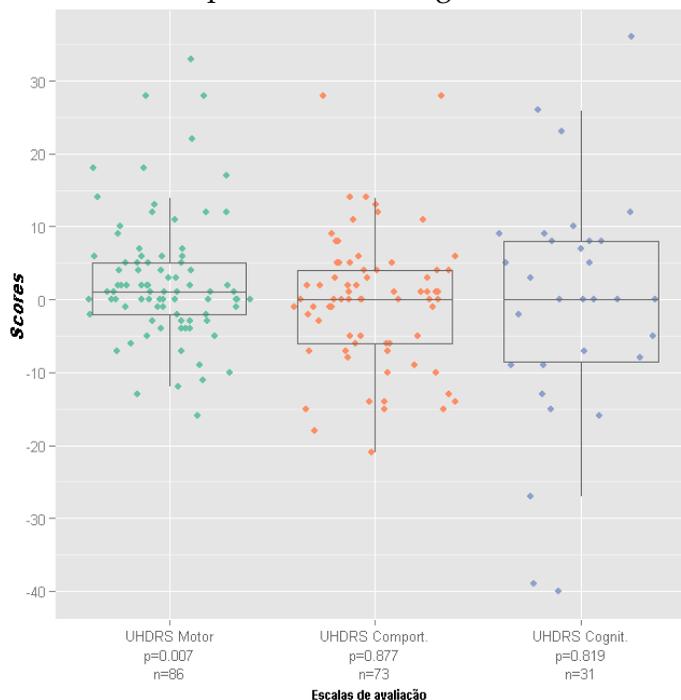
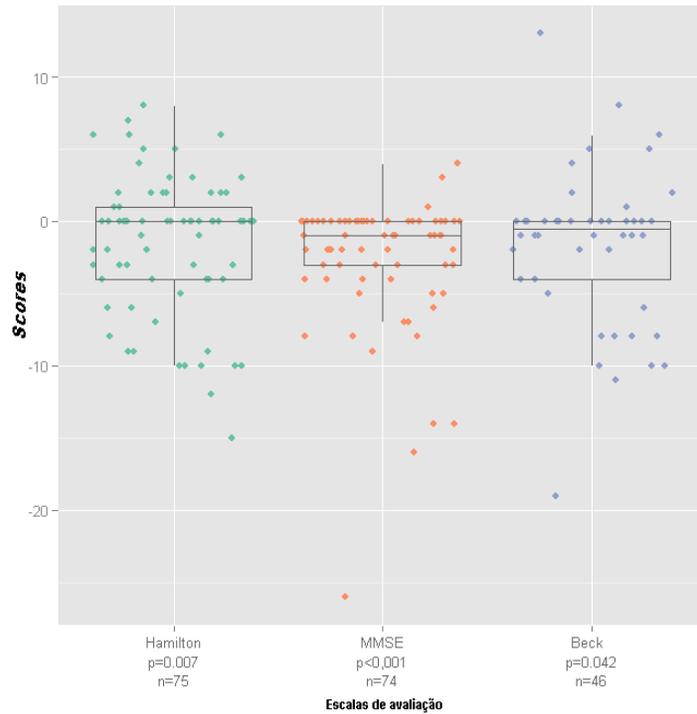
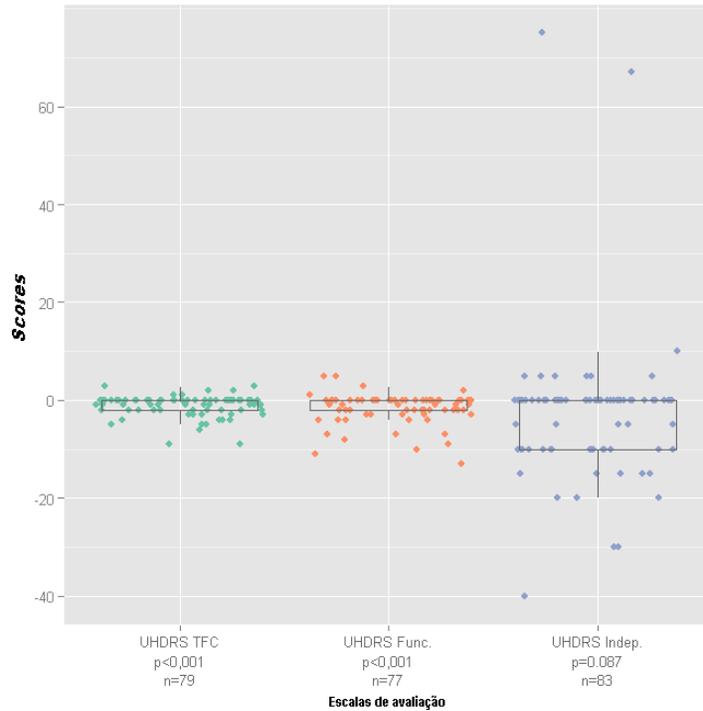


Figura 20: Variações da UHDRS entre duas consultas: intervalo de um ano na avaliação global dos doentes. Verifica-se que existem diferenças significativas nos valores da componente motora.



**Figura 21: Variações de pontuações entre duas consultas: intervalo de um ano na avaliação global dos indivíduos doentes.** Verifica-se que existem diferenças significativas nos valores do (MMSE) e escala de Beck.



**Figura 22: Variações da UHDRS entre consultas: intervalo de um ano na avaliação global dos indivíduos.** Verifica-se diferença significativa nos valores da TFC e de funcionalidade.

III.4.4. Avaliação UHDRS - Componente motora

A maior parte dos sintomas motores estão presentes na 1ª consulta e com pontuações iguais ou superiores a dois, com exceções notáveis da distonia e da rigidez que se apresentam de forma relativamente pouco frequente à data da primeira avaliação. Em 35 % dos doentes a graduação é superior a dois pontos (escala de severidade de 0 a 4) para todos os itens à excepção da bradicinésia, da distonia e da rigidez que são sintomas pouco frequentes na primeira avaliação. A comparação dos vários itens do *score* motor da escala UHDRS mostrou a existência de evolução significativa (Teste Friedman) na iniciação e velocidade das sacadas horizontais e verticais, na bradicinésia, na disartria e na marcha (Figuras 23 a 25). Regista-se também que a maioria dos doentes mantém o estadió entre consultas (variação=0). Por outro lado, os que agravam o seu estado, isto é, aqueles em que a variação é positiva são de uma forma geral mais numerosos que os que evoluem em sentido inverso.

Mostra-se nas Figuras 23, 24 e 25 para cada item do *score* motor da UHDRS a percentagem de doentes em cada classe, o que traduz a evolução da doença.

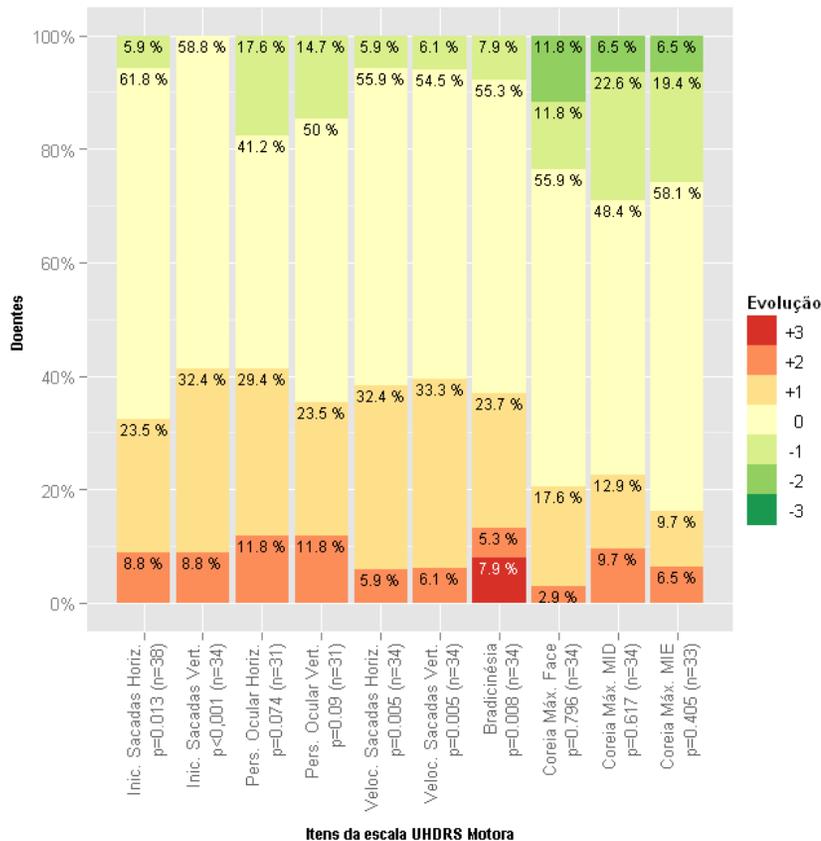
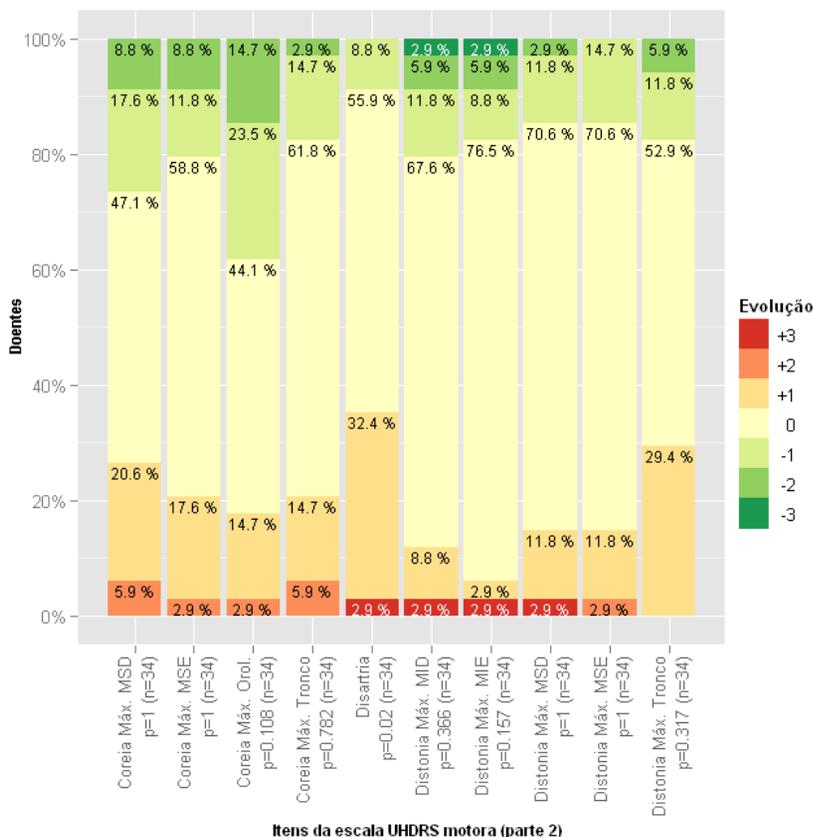


Figura 23: Variações entre consultas na avaliação motora dos indivíduos doentes (1ª parte da escala de 31 itens).

Para cada item da escala motora da UHDRS representa-se a amarelo a percentagem de doentes que mantém o mesmo estadiu, a amarelo escuro a percentagem que vê o *score* deteriorar um ponto, a laranja a percentagem que agrava dois pontos e a vermelho a percentagem de doentes que agrava três pontos. A melhoria é representada pela cor verde: verde-claro representando a percentagem de doentes que melhorou um ponto, verde-escuro a percentagem que melhorou dois pontos e verde mais escuro a percentagem que melhorou três pontos.



**Figura 24: Variações entre consultas na avaliação motora dos indivíduos doentes (2ª parte da escala de 31 itens).**

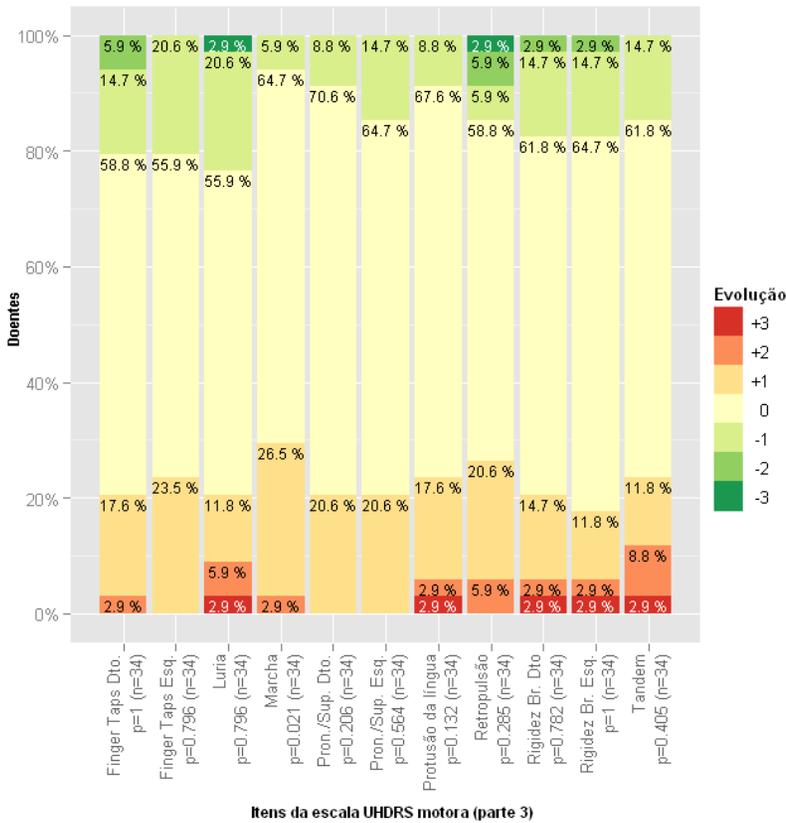


Figura 25: Variações entre consultas na avaliação motora dos indivíduos doentes (3ª parte da escala de 31 itens).

Como se pode ver nestas três Figuras a deterioração motora não é uniforme, sofrendo algumas funções uma progressão mais rápida. Assim, em relação aos movimentos oculares, 32.4% dos doentes agrava um ponto na iniciação das sacadas verticais e 8.8% agrava dois pontos ao fim de um ano de evolução da doença. De igual modo se verifica que a marcha deteriora significativamente: 11.8% dos doentes agravam um ponto, 8.8% agravam dois pontos e 2.9% sofrem um agravamento de três pontos nesse parâmetro.

Por outro lado, a coreia dos membros superiores sofre uma evolução favorável em cerca de 20.6 % dos doentes.

Regista-se a existência de uma correlação estatisticamente significativa ( $p=0.006$ ) entre a deterioração motora e o *score* de independência da escala UHDRS, sendo essa correlação fraca e negativa ( $p=-0.303$ ), ou seja, a um aumento da degradação motora corresponde uma expectável diminuição no *score* de independência (Tabela 13).

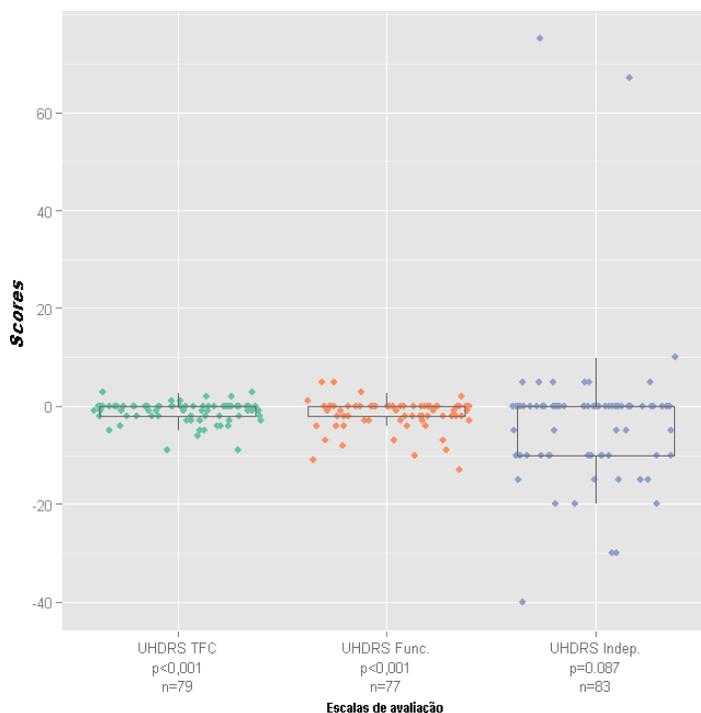
**Tabela 13: Correlação entre a deterioração motora e a escala de independência**

67

	Det. Motora	UHDRS Independência
Mín.	-16.0	-40.0
Mediana	1.0	0.0
Média	2.3	-3.5
Máx.	33.0	67.0
Desv. Padrão	8.2	11.6
$p$	-0.303	
p-value	0.006	

#### III.4.5. Avaliação UHDRS - Componente cognitiva

Como já acima foi referido, não se registam evoluções significativas (Teste t de Student para amostras emparelhadas) entre consultas, nos valores da componente cognitiva da escala UHDRS, o que é também comprovado quando se analisa individualmente cada um dos itens dessa componente (Figura 26).



**Figura 26: Variações entre consultas na avaliação cognitiva dos indivíduos doentes.** Não se observa evolução significativa em nenhuma das componentes da avaliação cognitiva.

A deterioração cognitiva não parece estar relacionada com o número de repetições CAG, não se registando correlações significativas entre as duas variáveis (Tabela 14,  $p=0.543$ ). Não foram também detectadas correlações estatisticamente significativas entre deterioração cognitiva e as várias componentes da escala UHDRS, nomeadamente com a componente motora ( $p=0.142$ ), com a componente comportamental ( $p=0.667$ ), com a TFC ( $p=0.169$ ). Apenas se observa uma relação estatisticamente significativa com a componente de independência ( $p=0.026$ ) sendo essa correlação positiva e moderada ( $p=0.4$ ), isto é a uma maior degradação cognitiva corresponde uma diminuição na independência (Tabela 15).

**Tabela 14: Correlação entre a deterioração cognitiva e o número de repetições CAG**

	Det. Cognitiva	Repetições CAG
Mín.	-40.0	38.0
Mediana	0.0	43.0
Média	-0.7	43.5
Máx.	36.0	50.0
Desv. Padrão	16.9	2.8
r	0.118	
p-value	0.543	

**Tabela 15: Correlação entre a deterioração cognitiva e a escala de independência**

	Det. Cognitiva	UHDRS Independência
Mín.	-40.0	-20.0
Mediana	0.0	0.0
Média	-0.7	-3.4
Máx.	36.0	10.0
Desv. Padrão	16.3	7.1
r	0.4	
p-value	0.026	

Também não se encontrou relação entre a deterioração cognitiva e os vários níveis de alfabetização (Tabela 16), nem com as formas de início juvenil da doença.

**Tabela 16: Correlação entre a deterioração cognitiva e a escolaridade**

	Det. Cognitiva				
	Det. cognitiva	Esc: Básico	Esc: Primário	Esc: Secundário	Esc: Superior
Mín.		-40.0	-27.0	-16.0	-8.0
Mediana		5.0	0.0	0.0	-8.0
Média		0.2	-3.3	0.9	-8.0
Máx.		36.0	9.0	26.0	-8.0
Desv. Padrão		20.2	12.5	13.3	
p-value		0.775			

## III.4.6. Avaliação UHDRS – Componente comportamental na população de doentes

Os sintomas comportamentais mais frequentes em ambos os momentos de avaliação foram a ansiedade, a apatia, a depressão e a irritabilidade. A agressividade torna-se mais frequente na segunda consulta, ao invés dos restantes três sintomas que se tornam menos prevalentes (Figura 27 e 28).

69

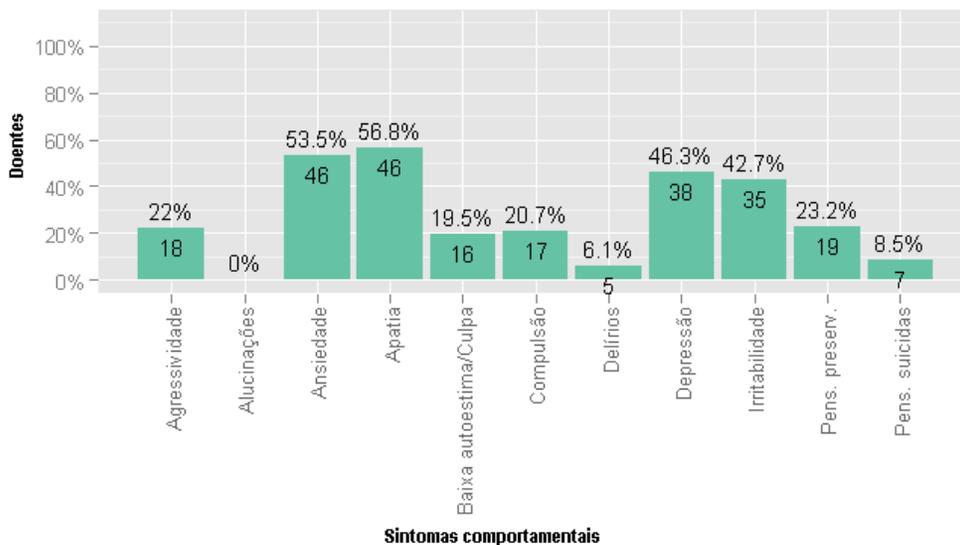


Figura 27: Sintomas comportamentais significativos nos indivíduos doentes na 1<sup>a</sup> consulta.

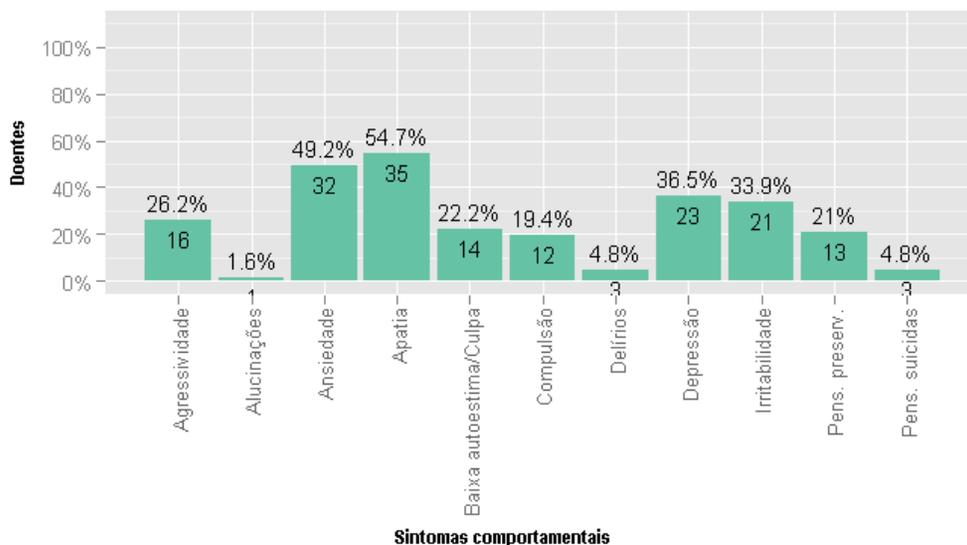


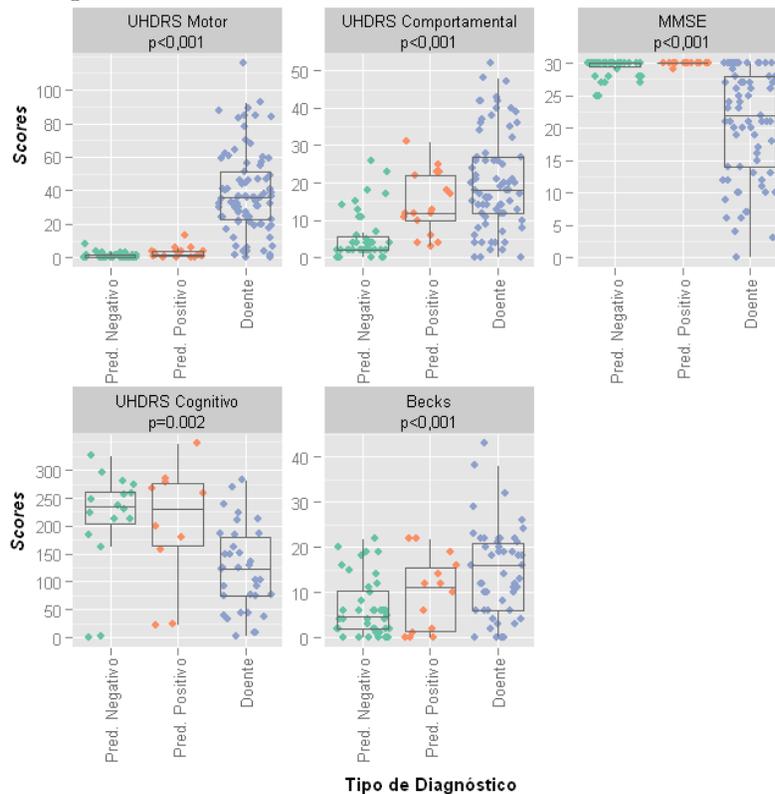
Figura 28: Sintomas comportamentais significativos nos indivíduos doentes na 2<sup>a</sup> consulta.



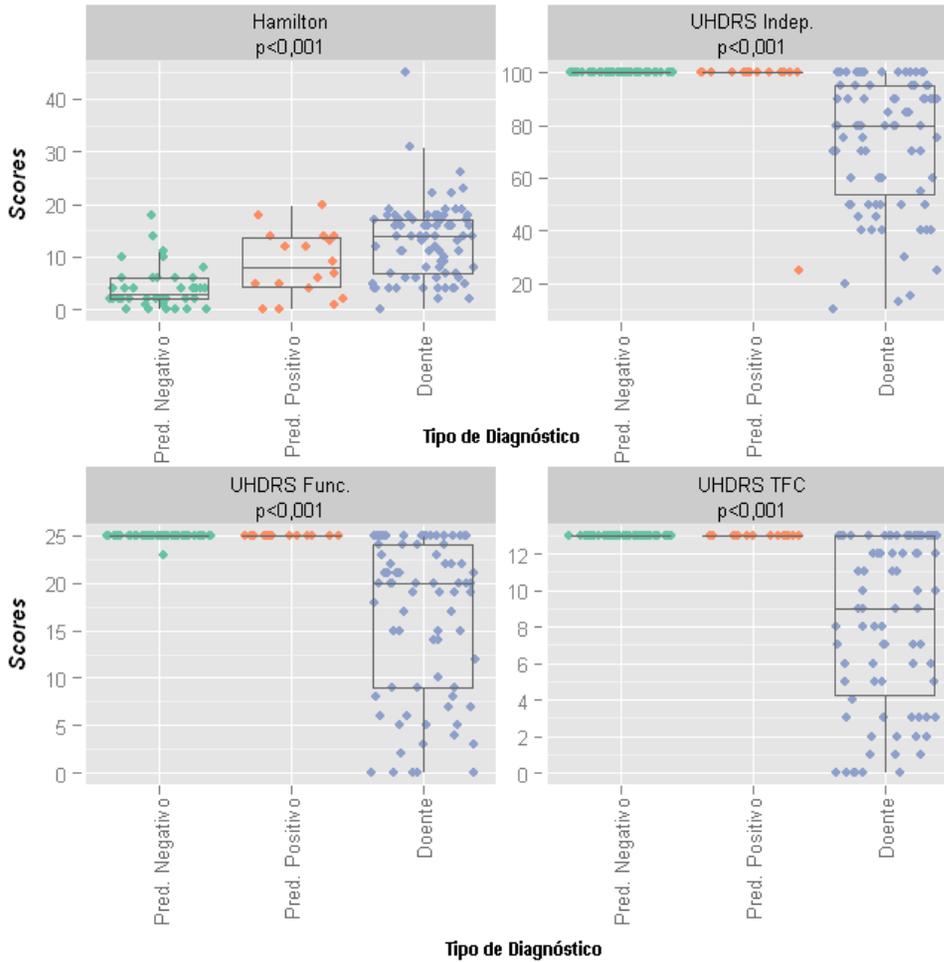
A maior parte dos sintomas comportamentais estudados manteve-se ausente entre a primeira e a segunda consulta, com as exceções da ansiedade, da apatia e da depressão. Estes três sintomas, a par da agressividade, da baixa auto-estima e da irritabilidade, apresentaram frequências significativamente diferentes em cada uma das consultas, sendo por isso a sua variação estatisticamente significativa (teste do Qui-Quadrado de Pearson). Não foi possível analisar estatisticamente a variação dos restantes sintomas devido ao número reduzido de indivíduos nalgumas das classes de variação, podendo assim concluir-se pela sua ausência nesta população de doentes.

#### III.4.7. Avaliação global

Os vários tipos de diagnóstico reflectem-se em diferentes resultados na avaliação global dos indivíduos, com os indivíduos com diagnóstico de DH a apresentarem valores consistentemente piores que os dos indivíduos preditivos positivos e negativos (Figura 31 e 32). Na comparação destes dois últimos grupos destacam-se os resultados da componente comportamental da escala UHDRS e da escala de Hamilton, em que os indivíduos preditivos positivos se aproximam dos resultados dos indivíduos doentes.



**Figura 31: Resultados da avaliação neuropsicológica dos indivíduos por tipo de diagnóstico (1ª parte).** Verifica-se que na vertente comportamental os scores dos indivíduos preditivos positivos se aproximam dos scores dos indivíduos doentes.



**Figura 32: Resultados da avaliação neuropsicológica e funcional dos indivíduos, por tipo de diagnóstico (2ª parte).** Verifica-se que nos scores da escala de depressão de Hamilton os indivíduos preditivos positivos se aproximam dos indivíduos doentes.

### III.5. Os indivíduos preditivos positivos e os indivíduos preditivos negativos

Comparando apenas os indivíduos preditivos, observa-se que existem diferenças testáveis e significativas na prevalência da depressão e da apatia. Encontra-se resumido na Tabela 17 o cálculo dos rácios de probabilidade (*odds ratio*) relativamente à presença de depressão e apatia como preditores de diagnóstico preditivo negativo e positivo. Regista-se que os rácios são significativamente diferentes de 1 (Teste Exacto de Fisher:  $p < 0.001$  e  $p = 0.001$ , respectivamente) com os indivíduos preditivos com apatia a terem 22 vezes maior probabilidade de serem preditivos positivos, e os indivíduos com depressão a terem uma probabilidade 8 vezes superior de serem preditivos positivos.

Tabela 17: Odds ratio relativamente à presença de apatia e depressão como preditores de diagnóstico positivo

Sintoma	Oddsratio	IC 95%	p-value
Apatia	1:22.2	1:3.35 – 1:612.14	<0.001
Depressão	1:8	1:2.19 – 1:33.46	0.001

### III.6. Os doentes. Caracterização por estadios

Os 94 doentes encontram-se em diversos estadios de acordo com a severidade da doença. Uma percentagem significativa encontra-se no estadio 3 e 4, respectivamente 39.4% e 20.2%, significando isto que a maioria dos pacientes desta amostra se encontra já com pouca autonomia para as actividades da vida diária. No estadio 5, acamados e institucionalizados, encontram-se 6.4 % dos doentes, como anteriormente mostrado na Figura 6.

Os doentes em estadios mais avançados apresentam contagens mais elevadas no número de repetições CAG, tendo tido uma progressão de doença mais rápida (Figura 33).

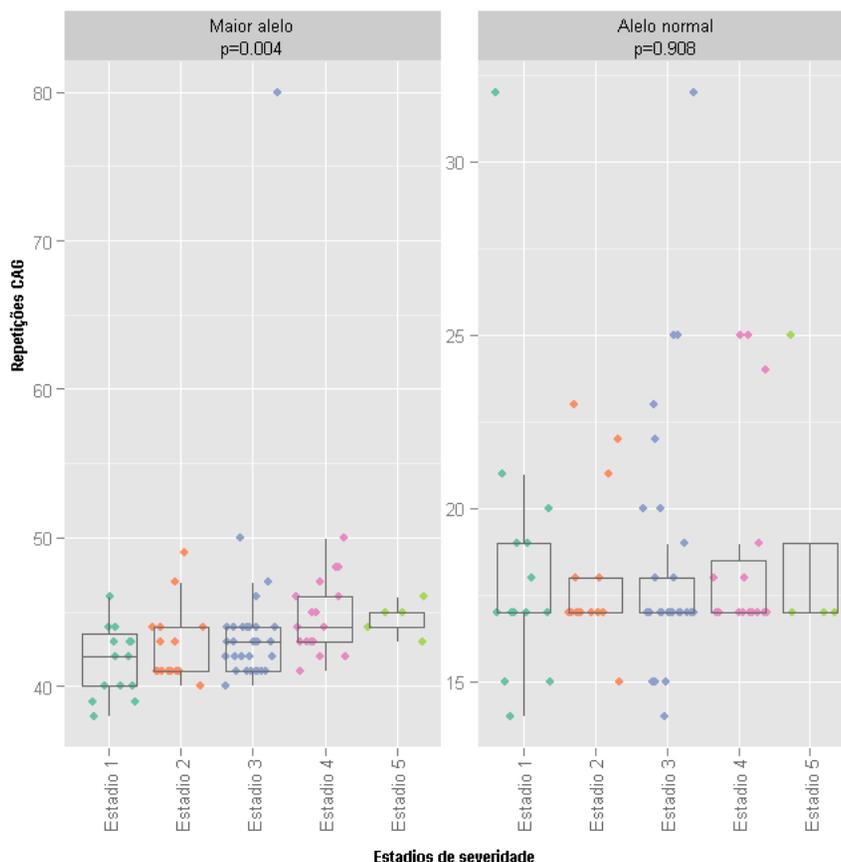


Figura 33: Número de repetições CAG e gravidade da doença. Verifica-se que nos estadios 4 e 5 se encontram os doentes com número maior de repetições CAG no alelo expandido apresentando uma forma de doença mais severa. O estadio em que se encontram reflecte-se nos diferentes resultados da avaliação global.

### III.7. Avaliação das terapêuticas utilizadas

Os doentes são tratados com diversos antipsicóticos nunca em monoterapia, e muito raramente com doses estáveis, isto é com modificações regulares e ajuste de dose frequente, pelo que a avaliação da eficácia terapêutica não é objecto desta análise.

74 Comparou-se no entanto, a evolução dos *scores* motores em dois tempos nos doentes que iniciaram tetrabenazina. Onze doentes foram tratados com tetrabenazina. Destes, sete têm duas avaliações distando de um ano, o que permite a comparação entre si (Tabela 18).

**Tabela 18: Comparação da variação nos *scores* motores ao longo de um ano nos 7 indivíduos tratados com tetrabenazina**

		Média	N	Desvio padrão	Erro padrão Média
Par 1	Score Motor 1	65,86	7	35,760	13,516
	Score Motor 2	69,71	7	32,541	12,299

Correlação entre pares

		N	Correlação	Sig.
Par 1	Score Motor 1 & Score Motor 2	7	,978	,000

Verifica-se que o *score* motor deteriorou de quatro pontos ao fim de um ano. Dez doentes foram tratados com pridopidina em contexto de ensaio clínico duplamente cego, posteriormente em ensaio aberto. Registamos a avaliação do *score* motor ao fim de 12 meses de tratamento.

**Tabela 19: Comparação da variação nos *scores* motores ao longo de um ano nos 10 indivíduos tratados com pridopidina**

		Média	N	Desvio Padrão	Erro Padrão
Par 1	Score Motor 1	42,67	10	21,459	7,153
	Score Motor 2	46,56	9	23,287	7,762

Correlação entre pares

		N	Correlação	Sig.
Par 1	Score Motor 1 & Score Motor 2	9	,744	,022

A avaliação da eficácia terapêutica aos doze meses mostra uma deterioração do *score* motor de quatro pontos (Tabela 19). A análise dos *scores* parcelares mostra redução da coreia e agravamento no *score* total da marcha e movimentos alternos.

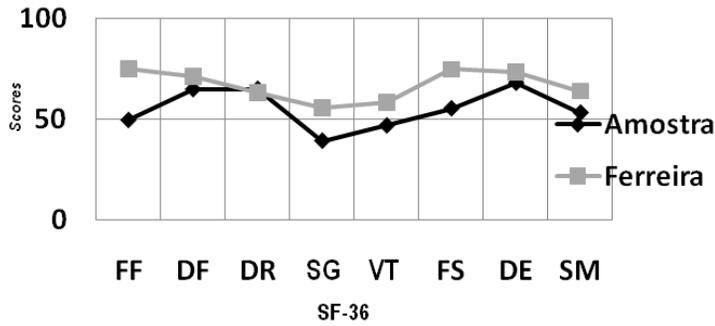
### III.8. Apresentação dos Resultados referente à variação da Qualidade de Vida na DH

Foram avaliados consecutivamente 23 doentes (13H, 10 M; idade média 42.4 anos) através da escala *Short-Form-36* (SF-36). A análise descritiva da amostra encontra-se exposta na Tabela 20, onde se pode ver tratar-se de doentes em estadios intermédios com *scores* motores da UHDRS moderados ( $28,64 \pm 24,87$ ). Foi critério para inclusão neste estudo apresentarem MMS normal, isto é, sem deterioração cognitiva.

**Tabela 20: Análise descritiva das características clínicas dos doentes avaliados pela escala de Qualidade de Vida SF-36**

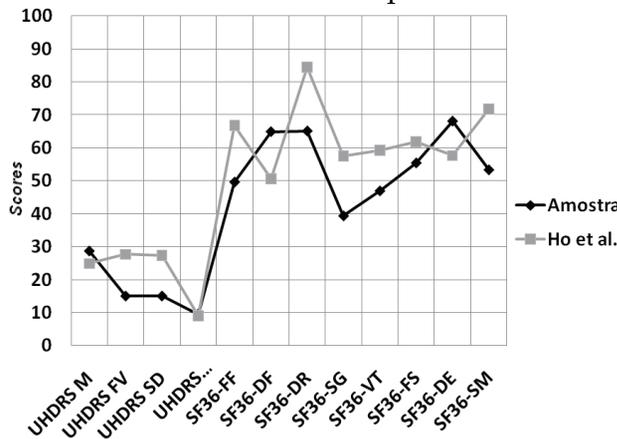
Variáveis	Amostra (N=23)
Género (feminino/masculino)	10 (43,5%) / 13 (56,5%)
Idade em anos	42,43 $\pm$ 12,67
<b>UHDRS</b>	
- Motor	28,64 $\pm$ 24,87
- Cognitivo	
<i>Verbal Fluency</i>	14,95 $\pm$ 10,10
<i>Symbol Digit</i>	20,77 $\pm$ 16,30
<i>Stroop Interference</i>	18,91 $\pm$ 13,50
- Comportamental	17,22 $\pm$ 11,86
Confusão (%)	30,4%
Depressão (%)	69,6%
Requer tratamento para depressão (%)	78,3%
Requer tratamento para irritabilidade (%)	21,7%
<b>Capacidade Funcional</b>	
Escala de Independência	83,04 $\pm$ 21,41
Capacidade Funcional Total	9,52 $\pm$ 4,38
<b>SF- 36</b>	
Função Física	49,57 $\pm$ 33,61
Desempenho Físico	64,95 $\pm$ 24,48
Dor Física	65,09 $\pm$ 29,12
Saúde em Geral	39,30 $\pm$ 25,94
Vitalidade	46,96 $\pm$ 22,55
Função Social	55,43 $\pm$ 34,71
Desempenho emocional	68,12 $\pm$ 26,43
Saúde Mental	53,39 $\pm$ 22,90

A Figura 34 mostra a comparação entre os resultados da SF-36 nesta amostra e os resultados obtidos para a população portuguesa normal, resultantes de um estudo prévio sobre a qualidade de vida numa população sem doença efectuado por Ferreira PL em 2003 (130).



**Figura 34: Demonstração da diferença entre as pontuações obtidas na SF-36 da amostra deste estudo e da população portuguesa normal.** FF- Função Física; DF- Desempenho Físico; DR- Dor Física; SG- Saúde em Geral; VT vitalidade; FS- Função Social; DE- Desempenho Emocional; SM- Saúde Mental.

Apresenta-se na Figura 35 a comparação entre as pontuações do SF-36 e da UHDRS da amostra com o estudo existente para DH de Ho *et al.*, 2009.



**Figura 35: Demonstração da diferença entre as pontuações do SF-36 e UHDRS da amostra deste estudo e da amostra do estudo referência / Ho *et al.*** Legenda: UHDRS M- UHDRS Motor; UHDRS FV- UHDRS Fluência Verbal; UHDRS SD- UHDRS *Symbol Digit*; UHDRS CFT- UHDRS Capacidade Funcional Total; SF36-FF - Função Física; SF36-DF - Desempenho Físico; SF36-DR - Dor Física; SF36-SG - Saúde em Geral; SF36-VT - Vitalidade; SF36-FS - Função Social; SF36-DE - Desempenho Emocional; SF36-SM - Saúde Mental.

Comparam-se os resultados da amostra com os valores da população portuguesa normal, existindo uma diminuição da dimensão física e mental na amostra estudada. Os resultados da UHDRS foram: *score* motor  $28,64 \pm 24,87$ ; *verbal-fluency*  $14,95 \pm 10,10$ , *symbol-digit*  $20,77 \pm 16,30$ ; *score* comportamental  $17,22 \pm 11,86$  e capacidade funcional total  $9,52 \pm 4,38$ . A componente comportamental da UHDRS não se correlacionou com nenhuma das subdimensões do SF-36, apesar de 70% dos doentes apresentarem sintomas de depressão e 78% fazerem tratamento anti-depressivo. Segundo o coeficiente de *Spearman*, a correlação entre as dimensões do SF-36 e UHDRS revela que a UHDRS motor apresenta uma correlação significativa com FF, DF e FS; o *Symbol Digit* apenas se correlacionou de forma significativa com DF e SG; o

CFT depende de forma significativa de FF, DF, SG e FS; e a UHDRS comportamental não se correlacionou com nenhuma subdimensão do SF-36.

### III.9. Apresentação dos Resultados Laboratoriais:

#### Disfunção bioenergética nos híbridos de doentes com DH

77

A fim de clarificar as alterações do metabolismo energético na DH, usamos como modelos linhas celulares de híbridos (sistemas híbridos citoplasmáticos) resultantes da fusão de plaquetas isoladas de seis doentes com DH geneticamente confirmada (42-44 repetições CAG) com células de teratocarcinoma humano depletadas de DNA mitocondrial (células NT2 rho0). Foram usados como controlos híbridos preparados a partir de três indivíduos saudáveis emparelhados pela idade.

Neste modelo celular começamos por analisar o metabolismo energético avaliando os níveis intracelulares de ATP em células incubadas na presença e na ausência de ácido 3-nitropropiónico (3-NP), um inibidor do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial (Figura 36). Observámos um aumento significativo dos níveis de ATP nos híbridos de doentes de DH, quer em condições basais, quer após exposição ao 3-NP, relativamente aos controlos. Apesar dos níveis mais elevados de ATP, o 3-NP, nas concentrações de 1 e 10 mM, induziu um ligeiro decréscimo dos níveis deste nucleótido sem que fosse detectável qualquer aumento nos níveis de ADP ou AMP (resultados não apresentados).

Com o propósito de esclarecer os mecanismos subjacentes ao aumento de ATP nos híbridos dos doentes, começámos por avaliar a actividade da via glicolítica nestas linhas celulares antes e após inibição da glicólise durante 8 horas (Figura 37). Para este fim as células foram cultivadas num meio sem glucose (RPMI-1640). Como podemos ver na Figura 37 A, houve um aumento da razão lactato/piruvato nos híbridos de doentes de Huntington, quando comparados com os controlos, o que sugere uma maior actividade da via glicolítica e explicaria o conseqüente aumento da produção de ATP nos doentes. A inibição da glicólise, na presença da 2-desoxiglucose (2-DOG), levou a um decréscimo marcado da razão lactato/piruvato nos híbridos dos doentes, relativamente ao observado nos controlos, o que sugere um papel chave para a glicólise na bioenergética dos híbridos dos doentes de Huntington. Nestas células observou-se um decréscimo da actividade da glucose-6-fosfato desidrogenase, a enzima reguladora da via da pentose fosfato (Figura 37 B) o que reforça a hipótese da metabolização preferencial da glucose pela via glicolítica nos híbridos dos doentes.

Em condições de inibição da glicólise, isto é, quando as células foram incubadas em meio sem glucose na presença de 2-DOG, os níveis intracelulares de ATP decresceram significativamente (Figura 38 A). Como se pode observar também nesta Figura, a inibição da ATP sintetase mitocondrial

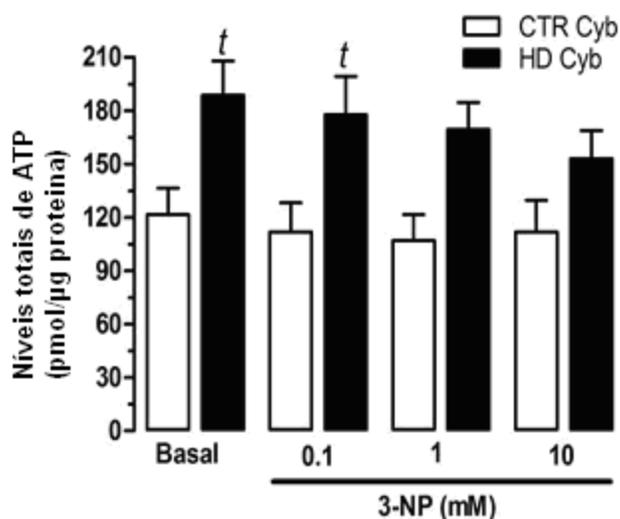
com oligomicina, na presença de glucose, provoca um decréscimo dos níveis de ATP nos cíbridos dos doentes para valores próximos dos observados nos controlos. Curiosamente, em condições de inibição da glicólise, a inibição da ATP sintetase provoca um decréscimo drástico dos níveis de ATP, tanto em cíbridos de doentes como nos controlos e os níveis de ATP em cíbridos de doentes não são recuperados na presença de piruvato (Figura 38 A).

Uma vez que a fosfocreatina pode ser utilizada para uma regeneração rápida de ATP analisámos a sua contribuição para a formação deste nucleótido em cíbridos de doentes de DH e em controlos. Como se pode observar na Figura 38B, após inibição da glicólise os níveis de fosfocreatina decrescem significativamente nos doentes, enquanto nos cíbridos controlo o decréscimo é moderado, sugerindo assim que a fosfocreatina contribui para manter os níveis de ATP nos cíbridos de doentes sujeitos a inibição da glicólise. Atendendo a que a glicólise pode ser activada perante um decréscimo da eficiência metabólica da mitocôndria, avaliámos os níveis de fosfocreatina estimulando a função mitocondrial com piruvato. Nestas condições os níveis de fosfocreatina decresceram nos cíbridos de doentes, sugerindo um papel importante para a fosfocreatina na manutenção dos níveis celulares de ATP.

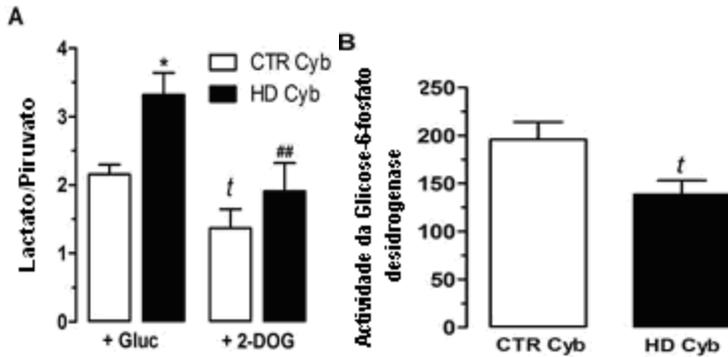
Estes resultados mostram a interdependência das duas vias de regeneração rápida de energia na forma de ATP: a via glicolítica e a via da fosfocreatina. Estes dados não só sugerem um aumento da oxidação da glucose nos cíbridos de doentes de Huntington, mas também que esta pode ser uma resposta compensatória para manter os níveis celulares de ATP. A inibição da ATP sintetase com oligomicina não altera os níveis de fosfocreatina quer quando a via glicolítica está activa quer quando a glicólise é inibida em cíbridos de controlos ou de doentes. A incapacidade do piruvato em restabelecer os níveis de ATP e de fosfocreatina, sugere um compromisso da eficiência metabólica da mitocôndria na DH.

Fomos assim avaliar mais detalhadamente os mecanismos que levam ao compromisso da bioenergética mitocondrial na doença de Huntington. Tinha sido anteriormente demonstrado pelo nosso grupo (Ferreira e tal, 2010) que a actividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial está mantida em cíbridos de doentes de DH (131). Com base nestes resultados e nos resultados apresentados, que mostram que a actividade glicolítica parece exceder a capacidade do metabolismo oxidativo nestas células, e a fim de clarificar o compromisso metabólico celular na DH, avaliámos a actividade das desidrogenases associadas ao ciclo do ácido tricarboxílico ou ciclo de Krebs. Medimos a razão NADH/NAD em extractos mitocondriais de cíbridos de doentes e de controlos (Figura 39) e observamos um decréscimo significativo da razão NADH/NAD mitocondrial nas células dos doentes, o que sugere uma disfunção das desidrogenases da mitocôndria. Determinamos então a actividade dos complexos enzimáticos da piruvato-desidrogenase, da alfa-cetoglutarato-desidrogenase e da malato-desidrogenase que são responsáveis pela formação da maior parte do NADH utilizado como dador de protões a

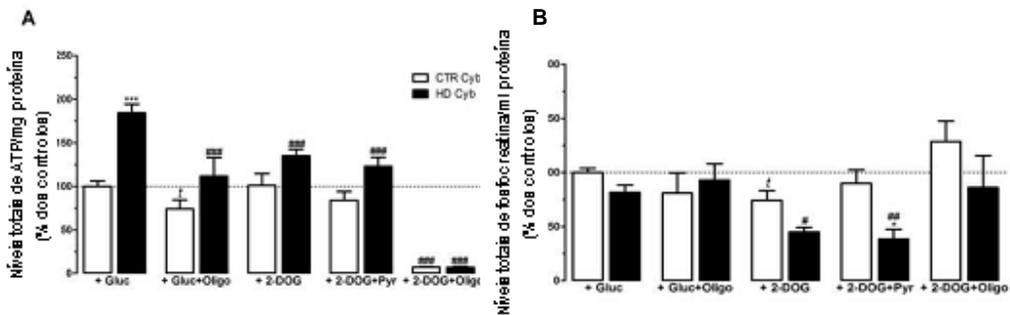
nível do complexo I mitocondrial (Figura 40). Em cíbridos de doentes de Huntington observámos um decréscimo significativo da actividade da piruvato-desidrogenase (Figura 40 A) que pode ser responsável pelo decréscimo da razão NADH/NAD (Figura 39). No entanto, a actividade da alfa-cetoglutarato desidrogenase estava aumentada nos cíbridos dos doentes (Figura 40 B) o que sugere um mecanismo de compensação para contrabalançar o decréscimo da produção de NADH pela piruvato-desidrogenase. A actividade da malato-desidrogenase não estava alterada nos cíbridos de doentes quando comparados com os controlos (Figura 40 C). A avaliação dos níveis mitocondriais de aspartato e glutamato mostrou que embora os níveis de aspartato fossem semelhantes em cíbridos de doentes e de controlos, os níveis de glutamato eram mais elevados nas células dos doentes (Figura 41) o que pode explicar o aumento da actividade da alfa-ceto-glutarato desidrogenase. Não se observam alterações dos níveis da glutamina enquanto os níveis de alanina decresceram um pouco, sugerindo o aumento da formação de glutamato pela alanina- transaminase como descrito por DeRosa e Swick em 1975 (138).



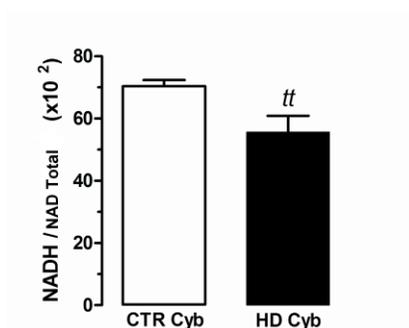
**Figura 36.** Níveis de ATP nos controlos (CTR Cyb) e nos cíbridos de doentes de Huntington (HD Cyb) em condições basais e após incubação com concentrações de 0.1, 1 e 10 mM de 3-NP durante 24 h. Os níveis de ATP foram determinados por HPLC. Os resultados apresentados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 a 8 experiências realizadas em duplicado. Verifica-se um aumento significativo dos níveis de ATP nos cíbridos dos doentes, quer em condições basais quer após exposição ao 3-NP, inibidor do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial ( $p < 0.05$ ).



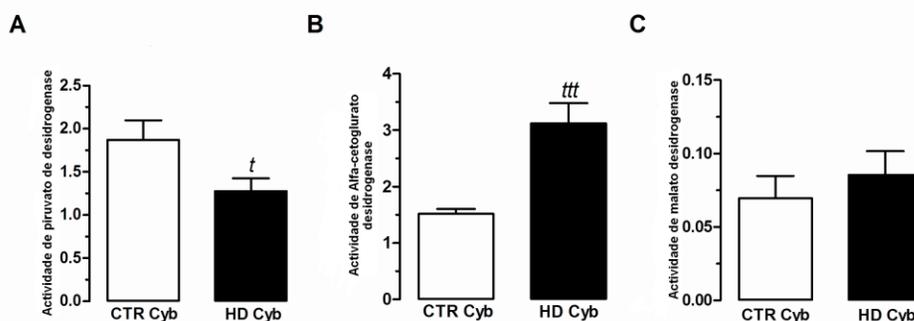
**Figura 37: Via glicolítica e via da pentose fosfato em (CTR Cyb) e cíbridos de doentes (HD Cyb)** A) Níveis de lactato/piruvato, células incubadas em meio com glucose (RPMI+Gluc), ou com inibição da glicólise (+2-DOG). Verifica-se aumento da razão lactato/ piruvato nos HD Cyb versus CTR Cyb, o que sugere maior actividade da via glicolítica. A inibição da glicólise na presença da 2-DOG origina um decréscimo na razão lactato/piruvato nos HD Cyb, relativamente aos CTR Cyb. B) Actividade da glucose-6-fosfato desidrogenase enzima chave da via da pentose fosfato. Verifica-se um decréscimo da actividade desta enzima nos HD Cyb. Os resultados expressos representam a média ± desvio padrão de 4 a 8 experiências realizadas em duplicado ou em triplicado. ( $p < 0.05$ ; Bonferroni post teste \*  $p < 0.05$  quando comparados com CTR Cyb (+ Gluc)  $p < 0.01$  comparado com HD Cyb (+Gluc)



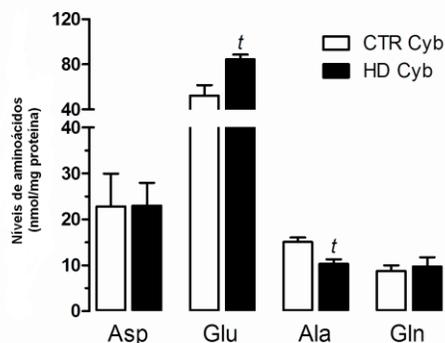
**Figura 38: Análise do ATP intracelular e níveis de fosfocreatina nos cíbridos de doentes e controlos antes e depois da inibição da glicólise (2-DOG), da inibição da ATP sintetase com oligomicina e após suplemento de piruvato.** A) Em condições de inibição da glicólise, células incubadas em meio sem glucose e na presença de 2-DOG verifica-se que os níveis de ATP decrescem significativamente. Observa-se também que a inibição da ATP sintetase com oligomicina, na presença de glucose provoca decréscimo nos níveis de ATP nos HD Cyb para valores próximos dos controlos. Após a adição de piruvato os níveis de ATP não são recuperados. B) Após inibição da glicólise verifica-se um decréscimo nos níveis de fosfocreatina nos HD Cyb. Verificamos também, que após a estimulação da função mitocondrial com a adição de piruvato os níveis de fosfocreatina nos HD Cyb decresceram. Os resultados apresentados expressam a média ± desvio padrão de 4 a 6 experiências independentes realizadas em duplicado.



**Figura 39: Níveis mitocondriais de NADH.** A razão NADH/NAD é determinada em extractos mitocondriais de cibridos de doentes e controlos. Verifica-se um decréscimo na razão NADH/NAD mitocondrial nas células dos doentes. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 4 a 6 experiências realizadas em duplicado. ( $p < 0.01$ )



**Figura 40: Actividade das desidrogenases da matriz mitocondrial.** A) Nos cibridos dos doentes observa-se um decréscimo significativo da actividade da piruvato-desidrogenase. B) Verifica-se aumento da actividade da alfa-cetoglutarato desidrogenase nos cibridos dos doentes. C) Não existe alteração em relação à actividade da malato-desidrogenase. Resultados expressos como a media  $\pm$  desvio padrão de 4 a 6 experiências realizadas em duplicado ( $p < 0.05$ , *ttt*  $P < 0.001$ , comparação com cibridos controlos).



**Figura 41: Níveis mitocondriais de aminoácidos.** Os níveis de aspartato, glutamato, alanina e glutamina foram determinados por HPLC nos extractos mitocondriais dos cibridos dos doentes e dos respectivos controlos. Verifica-se que os níveis de glutamato são mais elevados nos cibridos dos doentes. Não se observam alterações dos níveis de glutamina, enquanto os níveis de alanina são um pouco mais baixos nas células dos doentes. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 a 7 experiências realizadas ( $p < 0.005$ ).



## CAPÍTULO IV

### DISCUSSÃO

O diagnóstico clínico de DH não encontrou confirmação no estudo genético em 16 doentes (6 homens e 10 mulheres) e o seu seguimento permitiu claramente identificar outras patologias. Os casos em que o diagnóstico não se confirmou correspondiam a coreia associada a neurolupus, doença desmielinizante, coreia vascular e, principalmente, doença psiquiátrica (esquizofrenia).

Em nenhum destes casos se conhecia história familiar e os sintomas não eram os clássicos da DH. No entanto, os critérios clínicos de diagnóstico podiam aplicar-se: sinais motores acompanhados ou não de alterações psiquiátricas e cognitivas. O *gold standard* para o diagnóstico, o estudo do DNA, excluiu, naturalmente, esta doença.

A coreia foi o sinal de apresentação e um sinal proeminente em duas doentes com clínica sobreponível, às quais, posteriormente, foi feito o diagnóstico de neurolupus. Tratava-se de jovens, com 24 e 33 anos, que iniciaram de forma subaguda crises de pânico e ansiedade, a que se seguiu um quadro mais ou menos exuberante de movimentos coreiformes envolvendo preferencialmente os membros superiores, mas com assinalável assimetria. A atipia, nestes casos, residia na forma de apresentação, com instalação demasiado rápida de sintomas motores e na sua marcada assimetria.

Coreia e distonia foram a forma de apresentação de dois casos de doença desmielinizante e de um outro com etiologia vascular, em que os diagnósticos de esclerose múltipla e de síndrome de CADASIL com enfartes sub-corticais, foram confirmados por ressonância magnética nuclear e estudo genético.

Em cinco doentes, de idades entre os 60 e 65 anos, a presença de alterações cognitivas e de movimentos involuntários das extremidades levaram ao

diagnóstico provisório de DH. A completa ausência de informação e a impossibilidade de recolha de melhor história precipitaram a realização de estudo genético que se revelou negativo, sendo o diagnóstico final de coreia vascular.

Importa agora escrutinar os casos em que o diagnóstico de DH juvenil não foi confirmado. Esta hipótese foi colocada em doentes com idades entre 19 e 25 anos que se apresentaram com sintomas extrapiramidais: rigidez e distonia, envolvendo preferencialmente o tronco, com atingimento menos marcado dos membros; acompanhando um quadro psicótico de instalação subaguda. Os movimentos coreicos não eram, no entanto, proeminentes. Todos apresentavam grave distúrbio psicótico, tendo iniciado terapêutica neuroléptica para controlo desse distúrbio. Provavelmente, foi no contexto dessa terapêutica que surgiram as manifestações extrapiramidais, se bem que instaladas na primeira semana de tratamento. Investigados posteriormente, em todos as manifestações psiquiátricas podiam ser enquadradas em entidades nosológicas bem definidas de doença psiquiátrica, sendo o diagnóstico de esquizofrenia o mais comum de acordo com a DSM-IV.

Na realidade, as alterações psicóticas são comuns nas formas juvenis da doença. De acordo com os mais recentes trabalhos de Paulsen, na sequência do estudo *Predict-Hd* (91), sintomas psiquiátricos e mesmo doenças psiquiátricas precedem o início da sintomatologia motora na DH por vezes com um intervalo superior a 20 anos. Também num dos poucos estudos longitudinais que avaliou os sintomas psiquiátricos numa população de risco, Langbenh mostrou que a sua presença era fortemente preditiva do diagnóstico clínico da doença (25). Em relação à doença psiquiátrica, a psicose com características de esquizofrenia chega a ter, na DH, uma frequência estimada entre 6% e 25%, sendo as manifestações paranóides, aparentemente, as mais comuns (25, 139-141). De igual modo, os pacientes com idade de início mais precoce apresentam risco acrescido de desenvolvimento de psicoses. A prevalência de esquizofrenia ao longo da vida de um doente com DH é de 9% (142). Num trabalho recente sobre DH Juvenil os autores concluíram que em 19 de 29 doentes com idade de início abaixo dos 20 anos, ou seja em 65.5% das formas juvenis, os sintomas inaugurais foram alterações psiquiátricas graves com ausência de sinais motores, particularmente da clássica rigidez muscular (143).

Foi com esta informação que acabámos por prestar particular atenção às manifestações psiquiátricas, sobrevalorizando sintomas psicóticos com o objectivo de diagnosticar precocemente as formas juvenis da doença.

De facto, da mesma forma que os sintomas obsessivos e compulsivos - frequentes em estadios pré-motores da DH, mas de severidade distinta da que ocorre na doença obsessivo-compulsiva (144) - também a sintomatologia psicótica marcada não é comum nos estadios iniciais ou como manifestação inaugural da doença.

Como conclusão, afigura-se-nos que perfis bem definidos, com quadros alucinatórios, psicóticos, perturbações esquizotípicas, são raros na DH. Episódios de mania como manifestação inaugural de doença, na realidade, nunca foram encontrados nesta amostra. Em nosso entender, os sintomas psiquiátricos e a diversidade da sua fenomenologia nos estadios iniciais da DH não apresentam sistematização suficiente para serem enquadrados em categorias nosológicas, tais como a esquizofrenia, a perturbação obsessivo-compulsiva, e a mania.

A psicose, com clínica sobreponível a esquizofrenia, com alucinações visuais e auditivas, e sintomas negativos, poderá ocorrer nos estadios mais avançados, acompanhando o declínio cognitivo (87), mas muito raramente será a manifestação inaugural da doença.

#### **IV.1. Avaliação global da população em estudo**

##### **IV.1.1. Alelos**

Dos 168 indivíduos desta amostra, 94 são doentes em diversos estadios de doença e 74 são indivíduos em risco. Nos doentes, o tamanho do alelo expandido situa-se entre 38 e 80 repetições CAG (média  $43.5 \pm 4.6$ ), e o alelo normal compreende entre 14 e 32 repetições CAG (média  $18.4 \pm 3.3$ ). No que respeita aos indivíduos assintomáticos, em risco, que efectuaram teste preditivo, 22 apresentam um alelo expandido cujo número de repetições CAG se situa entre 36 e 48 (média  $42.9 \pm 2.6$ ) e 39 viram a doença definitivamente afastada, apresentando alelos de tamanho normal, o maior entre 12 e 28, e o menor entre 9 e 24 repetições CAG.

Assim, nesta população, verificamos que o tamanho da expansão CAG é sobreponível ao encontrado noutros países da Europa Central e Reino Unido. Os doentes da Europa do Norte apresentam um valor médio no comprimento da expansão CAG discretamente mais curto, com 42 repetições (145).

Diversos estudos têm, repetidamente, demonstrado existir uma relação inversa entre a idade de início da doença e o número de repetições do triplete CAG (25, 146-148), sendo este o principal factor determinante da idade de início. No entanto, nem toda a variância na idade de início da doença está na dependência exclusiva deste factor. Tem-se dado particular atenção ao tamanho do trinucleótido no alelo não expandido, existindo alguns estudos que demonstram a influência deste na determinação do início dos sintomas. Estes estudos relacionam o comprimento do alelo não expandido nos doentes com DH e, conseqüentemente, a expressão da huntingtina normal daí resultante com a idade de início da doença, tendo concluído que a expressão simultânea da htt normal e da htt mutada pode levar a um atraso no início da sintomatologia clínica da doença (149-151).

Outros genes, até ao momento não identificados, poderão também contribuir para a diversidade fenotípica da doença, nomeadamente no que diz respeito à idade de início. Na verdade, doentes com o mesmo número de repetições CAG podem divergir significativamente quanto ao início dos primeiros sintomas, o que se atribui à acção de genes modificadores, tendo sido pesquisados polimorfismos nos genes GRIK2, TBP, BDNF, HIP1, ZDHHC17 e TP 53, como possíveis modificadores do curso da doença (152, 153). Como já foi dito, o comprimento da expansão CAG é responsável por cerca de 45 a 70% da variância na idade de início da doença, sendo o restante da responsabilidade destes genes, negligenciando-se a acção de factores ambientais. Em estudos realizados em pares de gémeos de diferentes proveniências (América do Norte, Europa e Austrália) demonstrou-se que 65% a 71% da variância na idade de início depende exclusivamente do comprimento da expansão CAG, enquanto 11 a 19% dessa variância estará na dependência de factores genéticos que são comuns e partilhados por ambos os gémeos (154, 155). Esta informação estimulou a investigação molecular, com intensificação na procura de genes modificadores do curso da doença, sendo no entanto, os resultados obtidos até ao presente pouco conclusivos (156-158).

Mais recentemente, atribuiu-se ao gene codificador do PGC-1 $\alpha$  o papel de retardar o aparecimento dos primeiros sintomas na DH. Num estudo englobando 447 doentes, Weydt e colaboradores concluíram que a homozigotia para o haplótipo PPARGC1A bloco 2, o gene que codifica o factor de transcrição PGC-1 $\alpha$ , está associada a um atraso significativo na idade de apresentação dos primeiros sintomas. Este parece ser o primeiro estudo a confirmar claramente o efeito de um gene modificador do curso da doença (159, 160).

Por outro lado, em modelos experimentais (drosófila) foram já identificados potenciais modificadores da toxicidade da huntingtina mutada pelos factores de transcrição FOXO (Forkhead family of transcription factors). Os factores de transcrição FOXO são importantes reguladores dos mecanismos de sobrevivência celular, respondendo a agressões relacionadas com *stress* oxidativo, lesão do DNA e privação de nutrientes (161).

Resultados de diversos estudos sugerem que a expressão da huntingtina normal com a huntingtina mutada pode justificar o atraso no início das manifestações clínicas (25, 149, 150).

Foi por isso nossa intenção estudar, nesta amostra, a existência de uma possível interacção entre o tamanho do alelo expandido e o do alelo normal, que pudesse influenciar a idade de início dos primeiros sintomas.

Os alelos com 26 repetições CAG ou um número inferior a este, são classificados de normais, ditos de classe 1, enquanto os que tem entre 27 e 35 CAG são chamados “intermédios” compridos normais, grandes normais, mutáveis normais ou normais instáveis, ditos de classe 2 e não produzem sintomas de DH. Alelos com 36 a 39 repetições (classe 3) estão associados a um início mais tardio de doença e mostram baixa penetrância, enquanto acima de 40 CAG (classe 4) têm penetrância completa.

Na população aqui em estudo, 70.5% dos indivíduos tem um alelo expandido com um número de repetições CAG igual ou superior a 36. São doentes e portadores assintomáticos. Os indivíduos que realizaram um teste preditivo negativo têm alelos de classe 1, ou seja com um número de repetições até 26. Dos indivíduos preditivos positivos 4.5 % têm alelos de classe 3, entre 36 e 39, isto é de penetrância reduzida, relacionados habitualmente com um início mais tardio de doença. De igual forma esta classe de alelos só se encontrou também em 3.4% de doentes. Apesar de, na população portuguesa, ter sido reportada uma frequência relativamente elevada (3.7%) de alelos da classe 2, grandes normais (103), encontrámos esta classe apenas num indivíduo da nossa amostra, que chamámos de “borderline” porque, tendo realizado teste preditivo que mostrou 28 repetições CAG, apresenta manifestas alterações psiquiátricas necessitando de intervenção médica. A ausência de sinais motores leva a que não lhe tenha ainda sido colocado o diagnóstico.

Os alelos de Classe 2 podem originar novos casos de doença na sua transmissão, com alguns autores defendendo que a sua instabilidade é pequena uma vez que apenas 0.06% mostraram ser instáveis na volumosa amostra referente às famílias Venezuelanas (162). Outros autores reportando

instabilidade em cerca de 30% dos casos, de tal ordem que, ao expandirem originam alelos de penetrância completa, o que acontece em cerca de 14% dos casos (163). Tais discrepâncias denotam grande controvérsia neste tema.

No que respeita ao tamanho do alelo normal não se registou diferença com significado estatístico entre os três grupos da nossa amostra: doentes, indivíduos preditivos positivos e indivíduos preditivos negativos.

88

Nos indivíduos com diagnóstico de DH existe forte relação linear entre o número de repetições e a idade de aparecimento do primeiro sintoma ( $\text{idade} = 255.3 - 4.866 \times \text{repetições CAG}$ ,  $p < 0.001$ ,  $R^2 = 45.9\%$ ), com o número de repetições de tripletos CAG a correlacionar-se negativamente com a idade de início. Por aqui concluímos que o modelo de regressão é responsável por 45.9% da variância na idade de início sintomático, na nossa amostra. Por outro lado, apesar do coeficiente de regressão *Cox* ser significativo, o tamanho do menor alelo não teve qualquer influência na idade de início da doença.

Considerando agora os grupos de doentes com o mesmo número de repetições no alelo mutado (42 e 45 CAG) o tamanho do alelo normal não teve também correlação com a idade de início (coeficiente de regressão *Cox*).

Os resultados que obtivemos, não confirmam qualquer influência do tamanho do alelo normal no eclodir dos primeiros sintomas. Estes resultados estão, assim, em discordância com os de outros grupos, particularmente com os de Djousse (150), que defendem um papel importante do alelo normal modulando a influência que o alelo expandido tem na idade de início dos primeiros sintomas de doença. Na maior casuística publicada, juntando duas amostras com 221 e 533 indivíduos respectivamente, estes autores evidenciaram a influência do comprimento do alelo normal, concluindo que o tamanho deste pode mitigar a expressão da doença, particularmente nos indivíduos com um número mais elevado de expansões CAG no alelo mutado. Isto é, um alelo normal comprido atrasa o início da doença. Também Aziz e colaboradores (164) aplicando um modelo de análise de regressão, encontraram um efeito de interacção estatisticamente significativo entre o tamanho do alelo normal e o do mutado, apesar de esse efeito ser muito pequeno (0.001), o que pode sugerir que a sua significância resulta apenas de cambiantes no processamento estatístico aplicado a uma grande série. Mesmo assim, nesse estudo, a percentagem de explicação para a variância na idade de início aumentou apenas 0.5% quando aplicado o termo de interacção à equação de regressão.

Aplicámos o mesmo modelo de análise de regressão multilinear entre o número de CAG e o logaritmo da idade de início da doença, e não encontramos, uma vez mais, qualquer efeito atribuível ao tamanho do alelo normal no início dos sintomas da doença, não corroborando portanto estes resultados.

Estas diferenças podem ser devidas às diferentes dimensões das séries, ao processamento estatístico utilizado e ainda às desigualdades no conceito mais elementar de definição da idade de início da doença, o que constitui, aliás, uma limitação de todos os estudos. Reconhece-se que a doença se inicia quando surgem sinais motores inequivocamente identificáveis, tais como os movimentos involuntários coreico-discinéticos. Na verdade, o movimento voluntário está precocemente alterado na DH, mas a sua alteração é difícil de objectivar, mal avaliada e muito raramente referenciada como manifestação inaugural. Só depois da progressão da doença, em análise retrospectiva, se valorizam sinais pré-existentes que não se reconheciam como patológicos.

De igual modo os sintomas comportamentais e cognitivos iniciais são dificilmente reconhecidos, sendo a sua identificação influenciada provavelmente pelo nível educacional do doente, pela informação que detém sobre a doença e pelo ambiente sócio-cultural onde está inserido.

Em conclusão: nesta série apenas o comprimento da expansão de repetições do trinucleótido CAG no alelo mutado se relaciona com a idade de início dos primeiros sintomas. Verificamos existir uma forte relação linear entre o número de repetições CAG e a idade de aparecimento dos primeiros sintomas, de tal forma que o aumento de uma unidade no número de repetições faz prever uma antecipação em cerca de 5 anos na apresentação do sintoma inaugural, isto é, no início da doença. Por outro lado, ao contrário de alguns dados apresentados na literatura, na série aqui apresentada não se confirmou uma possível influência do tamanho do alelo não mutado na idade de início da doença, não existindo confirmação do possível efeito modificador exercido pelo tamanho do alelo normal.

#### IV.1.2. Educação

Verificamos que existe uma taxa de analfabetismo de 6.8 % nesta amostra, e 32% têm apenas quatro anos de escolaridade, isto é, confrontamo-nos com um baixo nível de literacia, inesperado numa população cuja média de idades ronda os 49 anos. Nesta amostra não existe relação entre o tipo de

apresentação da doença e o nível educacional prévio do paciente. Os doentes que têm habilitações correspondentes a curso superior (embora em número reduzido, cerca de 11%) não mostraram diferença na forma de apresentação do sintoma inaugural. Isto é, as características clínicas das manifestações iniciais não encontram correlação com o nível educacional dos indivíduos, não se observando relação entre o tipo de sintoma que primeiro é referenciado pelo paciente (perturbações cognitivas, comportamentais ou motoras) e a sua formação escolar e cultural prévia, ao contrário do que é referido noutras séries (165). Verificamos também que, quando avaliada a deterioração cognitiva pela UHDRS, esta não parece ser influenciada pelo nível educacional destes doentes.

Valoriza-se muito na actualidade o papel da educação na prevenção do declínio cognitivo, e muito se tem escrito sobre a função neuroprotectora que esta exerce nas doenças neurodegenerativas, particularmente na doença de Alzheimer. Existem vários estudos que mostram quanto o nível educacional prévio e o armazenamento de competências, como por exemplo a aprendizagem de línguas numa fase precoce da vida, podem retardar o declínio cognitivo (166, 167). Também a informação fornecida pelos estudos epidemiológicos na doença de Alzheimer vem nesse sentido, a doença apresentando prevalências mais baixas nas populações com nível educacional mais alto (168, 169).

Na DH não existe suficiente informação sobre o possível efeito que a reserva educacional poderá exercer quer na idade de início dos sintomas, quer nas características dos sintomas inaugurais. Num estudo recente, demonstrou-se que escolaridade mais alta se associa a um início mais precoce dos sintomas e à manutenção de *scores* mais baixos ao longo da progressão da doença (165). A percepção do início dos sintomas, sendo de interpretação subjectiva, pode ser mais facilmente assinalada numa população mais atenta, porque mais esclarecida. Já a progressão mais lenta é atribuída pelos autores a um efeito modificador exercido pelo número de anos de escolaridade. A educação surge assim, como factor modificador do curso da doença, exercendo um efeito neuroprotector.

Não encontramos esta relação na nossa amostra. A escolaridade também não influenciou o tipo de primeiro sintoma, que parece antes depender da idade em que este surge. Na verdade, nesta amostra, os sintomas emocionais/comportamentais são mais frequentes nas formas juvenis da doença, enquanto as formas tardias se apresentam principalmente por sintomas da série motora, o que ocorreu em 68.8% dos casos.

#### IV.1.3. Formas juvenis e formas tardias de doença

As formas juvenis representam apenas 6.5% da população aqui em estudo, percentagem um pouco mais baixa que a verificada noutras séries, em que 10 a 15% dos indivíduos afectados são jovens, iniciando a doença antes dos 20 anos de idade (170). Verificamos que, como era esperado, estas apresentam um número de repetições CAG significativamente superior ao das restantes formas. No entanto, ao contrário do referido noutras séries, não encontramos diferenças no que respeita à forma de transmissão, ou seja, a herança paterna ou materna é aqui recebida de forma homogénea. Este facto representa uma marcada dissonância com os resultados de outros estudos nos quais o pai é o progenitor afectado em 75% dos casos juvenis de doença (171, 172). Existe, no entanto, um outro estudo, no qual os autores chamam a atenção para a percentagem surpreendentemente elevada de formas juvenis herdadas por via materna (143).

91

Nesta amostra, não encontramos também o clássico fenótipo associado às formas juvenis. Nenhum dos doentes desta série, com início de sintomas abaixo dos 20 anos apresentou a forma clínica de *Westphal*, definida como entidade distinta, com síndrome acinético-rígido e presença de convulsões ou mioclonias. Pensamos que essa descrição, muito provavelmente, expressa fenótipos com grande número de expansões de trinucleótidos CAG e consequente maior severidade, em que a intensidade dos sintomas motores ensombraria os restantes, entre esses os sintomas psiquiátricos e comportamentais.

Constatamos que existem 16 doentes (17%) com início da sintomatologia depois dos 60 anos. Nestas formas tardias, curiosamente, os primeiros sintomas foram motores e só em cerca de 6% foram queixas cognitivas que encaminharam o doente ao médico. Nestes últimos o diagnóstico de DH emergiu no contexto do diagnóstico diferencial de demência de Alzheimer.

Em 83% das formas juvenis o sintoma da apresentação foi comportamental, o que aconteceu apenas em 6% das formas tardias. A sintomatologia psiquiátrica e comportamental precedeu os sinais motores em todos os doentes com formas juvenis, sendo os sintomas mais comuns a ansiedade, a irritabilidade e a depressão. Estes sintomas, apesar de inespecíficos, apresentaram gravidade suficiente para modificar a vida dos doentes e necessitar de intervenção médica, pelo que não só os consideramos relacionados com a doença, como entendemos serem o marco do seu início.

### IV.1.4. Evolução

Os doentes que analisámos encontram-se em estadios 3 e 4 de Shoulson, o que significa que a maior parte dos distintos sintomas motores da doença esteja presente, e que os *scores* totais de avaliação sejam elevados, já na primeira avaliação. No entanto, apercebemo-nos que a deterioração ao longo de um ano é constante, com grande variabilidade individual, alguns parâmetros sofrendo evolução mais significativa do que outros. Assim, na análise dos diferentes itens que constituem a componente motora da doença avaliada pela UHDRS, ressalta, como sofrendo maior agravamento ao longo do seu curso, a iniciação das sacadas, a velocidade das sacadas, a disartria e a marcha.

92

A deterioração nos movimentos oculares é manifesta nos doentes desta amostra, o que acontece num curto período de apenas doze meses. Cerca de 32% dos doentes agrava um ponto e 9% agravam 2 pontos o *score* da UHDRS correspondente à iniciação das sacadas verticais, sendo esta a variação mais significativa.

Actualmente a avaliação dos movimentos oculares é muito valorizada na DH, porque as alterações na motricidade ocular podem constituir um indicador da progressão da doença (173). Em particular os movimentos sacádicos (movimentos rápidos dos olhos, que mudam a direcção do olhar) são alvo, presentemente, de intensa investigação conjunta das ciências básicas e clínicas, uma vez que constituem um paradigma de estudo dos circuitos fronto-estriatais, os quais sabemos estarem também implicados no controlo das sacadas. Procura-se, assim, encontrar na sua alteração precoce um marcador de doença.

Dois estudos publicados em 2000 e 2006 (174, 175) valorizam as alterações dos movimentos oculares como sinais iniciais da doença, em particular no que respeita à latência dos movimentos sacádicos precocemente aumentada em indivíduos pré-sintomáticos. Já em 1945 André-Thomas (176) e, mais tarde, Petit e Milbled em 1973 (177) chamaram a atenção para a importância da avaliação das sacadas oculares como forma de detectar precocemente a DH. Posteriormente utilizou-se o registo electro-oculográfico para quantificar estas alterações que surgem quer na fixação, quer nos movimentos sacádicos e de perseguição (178). Estes trabalhos confirmam as alterações selectivas na motricidade ocular, particularmente nas sacadas verticais, e têm o mérito de explorar a sua relação com as estruturas anatómicas envolvidas. Pela primeira vez foi considerada a hipótese das alterações da motricidade ocular fazerem parte de um distúrbio motor mais global, em que a dificuldade na execução de

movimentos repetidos também se inclui, e que aponta para o envolvimento do lobo frontal e suas conexões com o núcleo caudado.

Golding e colaboradores consideram que a lentificação nas sacadas e o atraso nas sacadas reflexivas são manifestações da doença, sendo mais relevante o aumento do tempo de latência porque é uma alteração subtil que surge precocemente na fase pré-sintomática de doença (179).

93

A impossibilidade de suprimir as sacadas reflexivas (o movimento rápido do olhar quando aparece subitamente um estímulo visual, distractivo) e o atraso no início das sacadas voluntárias são os sinais oculares mais precoces da DH, e também os que, de forma mais consistente, são encontrados na doença (180).

Recentemente, Peltsch e colaboradores (181) demonstraram um aumento no tempo de latência das sacadas e erros na duração e no sentido direccionais das mesmas, em doentes com DH. Os autores realizaram o estudo em 9 doentes que compararam com controlos saudáveis. Neste estudo era pedido aos participantes a execução de uma tarefa que implicava a realização e supressão das sacadas voluntárias, isto é pró-sacadas e anti-sacadas, e uma tarefa de avaliação das sacadas guiadas pela memória, ou seja, as sacadas que se obtêm após o desaparecimento de um ponto de fixação, quando o indivíduo deve iniciar a sacada em direcção ou no sentido oposto ao de um estímulo previamente mostrado e retirado. Os resultados mostraram, nos doentes, um aumento dos tempos de reacção médios. Do mesmo modo, nas anti-sacadas os doentes executaram erros direccionais frequentes. Também nas sacadas guiadas pela memória o número de erros foi superior nos doentes, alterações que estão correlacionadas com a gravidade da doença, tornando-se mais marcadas com a sua progressão (85). Concluíram que a alteração na execução de paradigmas que impliquem sacadas voluntárias pode ser um indicador sensível de progressão da doença. O córtex frontal, cíngulo anterior e os gânglios da base são estruturas implicadas no controlo das sacadas voluntárias (182), de tal forma que o padrão de neurodegenerescência na DH traduz-se na progressiva alteração no controlo das sacadas oculares. A alteração mais precoce, nas fases iniciais, manifesta-se na iniciação das sacadas, progredindo com o aumento da latência destas, posteriormente tornando impossível a supressão de sacadas erróneas durante a execução das anti-sacadas, e finalmente necessitando do apoio de movimentos da cabeça para auxiliar o início do movimento sacádico (183).

De consistente, os resultados de diversos estudos indicam que o aumento da latência, a variabilidade na latência e a dificuldade na inibição das sacadas em direcção a um novo estímulo visual são as alterações mais marcantes da

doença (175, 179, 181). A importância destes achados reside no contributo que fornecem para o conhecimento dos mecanismos anatomofisiológicos subjacentes e seu envolvimento no processo de neurodegenerescência da DH:

Nos doentes da nossa amostra, o agravamento nos movimentos sacádicos observado ao fim de um ano está, assim, em concordância com o descrito na literatura.

94

Considerando agora os sintomas motores que também sofreram agravamento significativo ao longo do período de um ano de progressão da doença, verificamos que a bradicinésia, a disartria e as perturbações da marcha são, a seguir aos movimentos oculares, os sintomas que mais deterioram. Constatamos que o agravamento destes sintomas surge de uma forma independente do estadio inicial em que cada doente se encontra. Ao analisarmos para cada item do *score* motor da UHDRS a percentagem de doentes em cada classe, apercebemo-nos que a variação nestes três parâmetros traduz a evolução da doença. Nesta amostra, para além do agravamento nos movimentos oculares (particularmente no início e latência das sacadas), a evolução traduziu-se pelo aparecimento de bradicinésia, sintoma este pouco frequente na primeira observação, pelo agravamento da disartria e pelo agravamento na marcha. O agravamento na marcha será o factor que mais influenciará o estadio clínico e de independência do doente.

Na DH a alteração na marcha resulta da interferência de múltiplas componentes. A impersistência motora que é a principal característica inscrita no movimento voluntário na DH, parece ser a causa principal de disfunção. A impersistência motora leva à incapacidade na manutenção de constância na actividade de um grupo muscular, e interfere com a actividade de grupos implicados no ortostatismo e no início do acto motor voluntário. No entanto não é o único factor a comprometer a marcha na DH. A coreia dos membros inferiores, a distonia e a rigidez parkinsonica manifesta nos estadios mais avançados também a agravam (184).

As características da marcha na DH são habitualmente descritas como ausência de equilíbrio, balanceio bilateral, base alargada, perturbação nos movimentos associados dos membros superiores, atraso no iniciar do movimento e inconstância da velocidade imprimida ao movimento. Existe propulsão, festinação, variação no tamanho dos passos, flexão espontânea dos joelhos, retropulsão, ataxia e apraxia (185). Enumeramo-las porque o contributo que cada uma destas componentes fornece à disfunção é variável, mas de grande relevo porque a sua identificação implica diferentes abordagens terapêuticas. O atraso na activação dos mecanismos compensatórios posturais parece ser importante (186), sendo as quedas

repetidas a consequência destas alterações, com cerca de 75% dos doentes a referirem pelo menos um episódio de queda e cerca de 60% a referirem pelo menos um episódio no último ano, mesmo nos estádios iniciais e moderados de doença. Existe relação entre as quedas e a deterioração cognitiva (187), de tal forma que se têm desenvolvido escalas de avaliação da marcha para identificar os doentes que virão a ter maior tendência para quedas. Recentemente o teste de mobilidade *The Tinetti Mobility Test*, usado na avaliação da marcha dos idosos, foi experimentado em doentes de DH, para calcular com valor preditivo os doentes que têm maior possibilidade de vir a desenvolver quedas (188) e como tal a apresentar maior incapacidade funcional.

Na nossa amostra as alterações da marcha são de tal forma relevantes que a maioria dos doentes do estádio 4 de Shoulson e Fhan se encontram incapazes de marcha sem apoio, e obviamente todos os que se encontram no estádio 5, isto é cerca de 25% dos doentes neste momento em seguimento não têm independência motora e sofrem quedas frequentes. A ausência de terapêuticas adequadas de apoio de fisioterapia contribui para a franca deterioração nesta componente da doença. De igual forma, os traumatismos cranianos resultantes de quedas foram a segunda causa de morte no nosso estudo.

#### **IV.2. Avaliação comportamental e psiquiátrica nos indivíduos doentes e pré-sintomáticos**

Na população estudada, os sintomas comportamentais mais frequentes foram a ansiedade (53.5%), a apatia (56.9%), a depressão (46.3%) e a irritabilidade (42.7%), sintomas estes presentes desde o início da doença e registados na primeira avaliação, enquanto a agressividade e baixa auto-estima são manifestações mais tardias que se tornam mais prevalentes na segunda observação, parecendo pois surgir com a progressão da doença.

Verificou-se que a apatia ocorre independentemente da depressão, não se observando relação entre si, o que sugere diferentes mecanismos subjacentes à sua gênese. Observou-se ainda que a apatia interfere com a Capacidade Funcional Total (relação estatisticamente significativa) o que não acontece com a depressão, sendo por isso um sintoma que interfere na progressão e estadiamento da doença.

Os sintomas comportamentais não regridem ao longo da evolução da doença, não sofrendo também grande variabilidade ao fim de um ano.

Comparamos, de seguida, estes sintomas nos indivíduos em risco, preditivos positivos versus preditivos negativos (que viram a sua doença excluída, funcionando como controlos saudáveis dos primeiros). A bateria utilizada é a da avaliação comportamental da UHDRS, conforme descrito na secção Material e Métodos, o que representa já uma limitação do estudo porque se trata de uma avaliação baseada nas respostas dos indivíduos, com ocasional auxílio dos seus familiares.

Nestes dois grupos, não encontramos diferenças significativas em nenhum domínio, à excepção da presença de depressão e apatia. Existe uma relação estatisticamente significativa no que diz respeito à depressão, de tal forma que indivíduos com *score* superior a 4 (este *score* é o produto da frequência de ocorrência do sintoma pela gravidade do mesmo) na avaliação do item depressão têm uma probabilidade 8.5 vezes maior de serem preditivos positivos do que preditivos negativos.

Surpreendentemente, os indivíduos pontuando valores superiores a 4 na avaliação do item apatia apresentam uma probabilidade 26.3 vezes superior de serem preditivos positivos que negativos.

A apatia ocorre nos estadios precoces e é um sintoma mais frequente nos portadores assintomáticos que nos seus controlos, podendo ser, assim, um precoce marcador da doença.

As manifestações comportamentais e psiquiátricas na DH são múltiplas e variadas compreendendo desde perturbações do humor, distúrbios de ansiedade, comportamentos obsessivos, compulsões, agressividade, irritabilidade e apatia, todas elas incapacitantes e fazendo parte do vasto espectro da doença. Acontece que, ao contrário das manifestações motoras, estas alterações são inconstantes no seu aparecimento, podendo apresentar-se com carácter exuberante em alguns doentes e estar completamente ausentes noutros. O seu reconhecimento é de fundamental importância porque são potencialmente tratáveis, são uma causa comum de incapacidade e hospitalização e, em fases avançadas da doença, são frequentemente responsáveis pela institucionalização dos doentes. Para além disso são estas alterações que têm a mais robusta associação com a capacidade funcional, comprometendo-a mais do que as perturbações motoras ou cognitivas (189).

Nos últimos anos têm surgido inúmeros estudos sobre a psicopatologia da DH quer ao longo da evolução da doença, quer nas fases iniciais ainda antes da ocorrência dos sintomas motores. Apesar de vasta, a investigação existente não traz informação sobre a verdadeira prevalência destes sintomas, nem

sobre a sua magnitude, o que se prende com as diferentes metodologias utilizadas nos estudos, o pequeno número de doentes observado, a utilização de diferentes instrumentos de avaliação não standardizados e a ausência de grupos de controlo. A dificultar ainda uma correcta avaliação dos sintomas comportamentais está o facto de o seu reconhecimento se basear muitas vezes em questionários de auto resposta. Nesta área lidamos com a inexistência quase absoluta de dados experimentais o que limita ainda a sua valorização. No entanto, desde os trabalhos de Folstein que se considera que as alterações psiquiátricas existem e podem preceder os sintomas motores em cerca de 20 anos (190).

A apatia, conceito que tem variado ao longo dos anos, pela sua importância e pelo facto de aparecer precocemente no decurso da doença, merece uma atenção especial. Foi reconhecida muito cedo como fazendo parte da personalidade dos doentes com DH de tal forma que em descrições iniciais se encontra o termo “Coreoapatia” para descrever a especificidade da personalidade destes doentes. Inicialmente foi definida como a “ausência de motivação, estando a consciência preservada” (191). Mais recentemente, Richard Levy e Bruno Dubois (192) consideram-na uma alteração comportamental que leva à redução de um procedimento direccionado, ou seja, apatia é a diminuição de comportamentos auto-gerados, voluntários com um propósito ou objectivo conhecidos como *Goal-Directed Behaviour* (GBD).

Deste modo a apatia não é apenas um conceito psicológico, mas deve poder ser objectivamente mensurada, existindo escalas para a sua quantificação capazes de medir a redução num comportamento auto-gerado. Na apatia é o mecanismo *self-generated* que está comprometido, estando mantidos os comportamentos de resposta reactivos a estímulos externos, que serão adequados se a solicitação externa for suficientemente estimulante. A alteração reside na própria génese do comportamento voluntário e motivado.

De acordo com este conceito, apatia enquanto redução de um comportamento direccionado, motivado, traduz uma disfunção a nível da elaboração, da execução ou controlo desse comportamento (193). Surge quando os circuitos que geram e controlam uma acção voluntária e motivada estão alterados, o que desde muito cedo se correlacionou com o córtex pré-frontal (194, 195). Noutras doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson e a paralisia supranuclear progressiva, a apatia tem sido repetidamente referenciada, aparecendo como manifestação clínica da disrupção dos circuitos córtex pré-frontal-gânglios da base, já identificados e implicados na génese dos comportamentos auto gerados, intencionais. Estes circuitos estabelecem ligações entre o córtex pré-frontal e os gânglios da base (GB)

particularmente o estriado e o pálido interno, o que faz com que a apatia surja em situações de lesão quer do córtex pré-frontal quer dos GB, não estando ainda totalmente esclarecido o mecanismo patofisiológico para esta fenomenologia comum.

Estão identificados pelo menos cinco circuitos paralelos que conectam o córtex frontal aos GB (196), e são conhecidos os neurotransmissores que modulam a sua acção. Dois circuitos, o primeiro com origem na área motora suplementar, e o segundo com origem na área visual frontal oculomotora (Broadman 8), estão implicados em funções exclusivamente motoras. Os circuitos dorsolateral pré-frontal, orbito-frontal e cingular anterior identificam-se de acordo com a área cortical que lhes dá origem, e estão relacionados, respectivamente, com a função executiva, o comportamento social e os comportamentos motivados (GDB). Em 2001, Litvan encontrou associação entre a disfunção destes circuitos e manifestações neuropsiquiátricas com tradução em quadros clínicos bem definidos (197). Foi demonstrado, usando técnicas de imagiologia estrutural e funcional, o envolvimento dos diferentes circuitos de acordo com a psicopatologia implicada. Assim, na neurose obsessivo-compulsiva estudos imagiológicos e de tomografia de emissão de positrões com F18 (flúor-2-desoxiglicose) confirmaram o envolvimento dos circuitos orbito-frontais nesta patologia, relacionando a compulsão e a ideia intrusiva com a desregulação deste circuito. Na depressão da doença de Alzheimer e da doença de Parkinson a imagiologia funcional mostrou acentuado hipometabolismo no córtex orbito-frontal e dorso-lateral. A esquizofrenia tem sido também um modelo de vasta investigação com as alterações da personalidade e os comportamentos anti-sociais que os doentes apresentam a serem associados a perturbações dos circuitos orbito-frontais. Do mesmo modo as alterações no planeamento e processamento de informação que traduzem disfunção executiva, encontram ligação ao circuito pré-frontal dorso-lateral (198).

Foi a partir destes trabalhos iniciais que se definiu a síndrome do cíngulo anterior e se percebeu a importância desta área na mediação de comportamentos motivados, a sua disfunção gerando apatia e comportamentos de inibição (sobretudo patentes nos comportamentos que requerem a tomada de decisões). A apatia ocorre, assim, em diversas doenças neurodegenerativas envolvendo o circuito cingular anterior e as estruturas subcorticais de ligação. Estudos pioneiros de imagem funcional com Tomografia Computorizada de Emissão de Fótons demonstraram que, na doença de Alzheimer na qual a apatia é um sintoma comum, existe marcada hipoactividade e redução no fluxo sanguíneo cerebral no córtex cingular

anterior, e que esta alteração parece correlacionar-se com a magnitude do sintoma (199).

Na DH tem sido um sintoma muito valorizado, tendo Paulsen referido a sua presença em mais de metade dos doentes em fase pré-sintomática e sugerido que a apatia pode ser um marcador da doença (200).

99

Verificamos ainda, na nossa amostra, que a apatia se correlaciona com a deterioração cognitiva e com o declínio funcional, não se correlacionando com a existência de depressão. Estes resultados reforçam a convicção de que apatia e depressão são dimensões distintas.

São escassos os estudos que relacionam depressão e apatia na DH. O estudo de Naarding em 2009, incidindo numa população de 34 doentes, concluiu que a apatia é mais frequente que a depressão e que são dimensões distintas. Mais importante, concluiu ainda que a apatia se correlaciona com a deterioração cognitiva e o declínio funcional ao contrário da depressão que não tem qualquer correlação. Neste estudo a apatia é um evento mais tardio na doença enquanto a depressão surge mais precocemente (201).

Mais recentemente, foi publicado o primeiro estudo em doentes pré-sintomáticos com alterações frontais, envolvendo 745 doentes classificados de *expansion- positive* (202). Esta designação pretende reformular o conceito de pré-sintomáticos, atendendo a que, na realidade, são claramente sintomáticos em relação às manifestações psiquiátricas e comportamentais da doença, apenas ainda livres de sintomas motores. Neste estudo, que inclui até à data o maior número de indivíduos, os participantes do *Predict-HD*, os portadores da mutação (*expansion positive*) apresentaram significativas alterações que os autores apelidaram de comportamentos frontais. Neles se incluem a apatia, a desinibição e a síndrome disexecutiva. Este é o mais importante estudo sobre alterações comportamentais na DH, incidindo em comportamentos que aparentam estar na dependência dos circuitos pré-frontais subcorticais. Na DH, a apatia, a disfunção executiva e a desinibição são manifestações precoces da doença. A estes sintomas de envolvimento frontal os autores acrescentam a perda de *insight*, ou seja a deficiente consciencialização dos seus próprios défices. Os autores utilizaram uma escala de avaliação de diversos domínios comportamentais frontais, a *Frontal System Behavioral Scale*, com subescalas direccionadas à quantificação da apatia, da desinibição e da função executiva. O estudo é complementado com investigação imagiológica por Ressonância Magnética e volumetria, considerando que alterações na volumetria do corpo estriado podem constituir um marcador da progressão da doença. Os indivíduos preditivos positivos foram comparados com os participantes do

mesmo estudo que viram excluída a situação de portadores da mutação. Os resultados deste estudo, o primeiro a especificamente avaliar a disfunção frontal na fase pré-clínica da doença, vieram demonstrar que a apatia, a disfunção executiva e a desinibição são significativamente mais prevalentes nos portadores da mutação, e que precedem o início previsível da doença em mais de 10 anos. Outra importante conclusão do estudo é que as alterações comportamentais frontais não só existem precocemente como se associam a outros marcadores da progressão da doença, nomeadamente acompanham alterações cognitivas subtis.

Todo este conhecimento faz-nos valorizar estes sintomas, sendo os achados da nossa amostra concordantes com a literatura existente. A avaliação dos sintomas comportamentais pode trazer informações importantes sobre a anatomia funcional do córtex frontal e as suas relações com os GB. Esta é uma área em que a imagiologia funcional trará, seguramente, um importante contributo.

Parece claro que o envolvimento pré-frontal estriatal é dominante na DH. É necessário, no entanto, desenvolver instrumentos que melhor explorem e permitam mais rigorosa avaliação da sintomatologia clínica daí resultante.

### IV.3. Discussão Terapêutica

#### IV.3.1. Tetrabenazina

Apenas 11 doentes foram submetidos a terapêutica com tetrabenazina e destes só 7 tiveram avaliação aos 6 e 12 meses utilizando a UHDRS. Nestes doentes (estádios 3 e 4 de Shoulson e Fahn) a média dos *scores* motores foi de 65.8 na primeira avaliação denotando grande compromisso motor, devido à existência de coreia e distonia em todos os segmentos corporais, o que constituiu um critério de selecção para a utilização deste fármaco, disponível exclusivamente em farmácia hospitalar. Ao fim de 12 meses, apesar de subjectivamente se considerarem melhor, o *score* motor médio agravou 4.85 pontos, passando para 69.71 pontos. Apenas um doente com uma dose de 75mg/dia teve redução de 5 pontos na pontuação da UHDRS. Não havendo evidente melhoria nos restantes doentes, também não surgiram efeitos secundários que levassem à interrupção ou ao abandono do tratamento.

A tetrabenazina é um composto introduzido em 1956, como antipsicótico, por ser um inibidor do transportador vesicular das monoaminas (dopamina,

serotonina e noradrenalina). Apresenta também uma função de antagonista do receptor dopaminérgico pós-sináptico. Esta dupla acção torna-a particularmente eficaz nos movimentos hiperkinéticos (203). Em 2008 a tetrabenazina foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) com indicação para o tratamento da coreia na DH, e é até ao presente o único fármaco aprovado para esta doença. É um depletor dopaminérgico que actua como inibidor reversível do transportador vesicular das monoaminas tipo 2 (VMAT2 -vesicular monoamine transporter type 2), apresentando maior selectividade para a dopamina do que para as outras monoaminas. O maior número de locais de ligação situa-se no estriado, putamen e núcleo acumbens, áreas que se sabe serem as inicialmente atingidas na DH. A sua ligação ao VMAT2 é reversível, com duração de acção de algumas horas, o que o diferencia de outros agentes como a reserpina, e lhe confere muito menor número de efeitos secundários. O seu efeito anticoreico e noutros movimentos involuntários é conhecido desde os anos sessenta, mas a sua eficácia na coreia da DH foi convincentemente demonstrada num estudo duplamente cego, versus placebo, conduzido pelo *Huntington Study Group* em 2006 (204). Nesse estudo, que englobou 84 doentes, a dose de tetrabenazina foi titulada de forma progressiva até 100 mg/dia, sendo o objectivo primário a redução da coreia avaliada segundo a UHDRS. Os resultados demonstraram uma redução de 5 pontos nesta escala, no item que quantifica os movimentos coreicos nos diversos segmentos corporais. Cerca de 50% dos doentes medicados com tetrabenazina tiveram uma redução superior a 6 pontos na avaliação da coreia, resultado francamente positivo, o que, aliado à sua relativa boa tolerabilidade levou à aprovação deste fármaco numa doença considerada até então órfã. Os efeitos secundários mais frequentes desta terapêutica são a ocorrência de fadiga, náuseas, sonolência e insónia. Como aconteceu um suicídio durante o estudo, as recomendações na sua utilização impõem regular monitorização para despiste de agravamento dos sintomas depressivos e risco de suicídio. Posteriormente, o *Huntington Study Group* realizou um ensaio com seguimento dos doentes mais prolongado, 80 semanas, com resultados também positivos, particularmente no que se refere ao controlo dos movimentos coreicos (205).

O número de doentes tratados por nós é pequeno, e em estadios avançados da doença, o que pode condicionar a aparente ausência de resposta na avaliação motora. Efectivamente na nossa amostra, ao considerarmos todos os doentes submetidos a diversas outras terapêuticas, apercebemos que 46 doentes agravaram o seu *score* motor (55.3 %) e só 25 apresentaram uma melhoria ao fim de um ano de seguimento.

Nos doentes que agravaram o *score* motor ao fim de um ano, procurámos saber a relação com o número de repetições CAG, isto é, esclarecer se uma

pior evolução se correlacionaria com uma maior expansão do trinucleótido CAG. Na realidade, nos 46 indivíduos que apresentaram um declínio da função motora, a média de CAG no alelo expandido foi de 43.2 e nos 25 doentes que viram melhorada a sua função motora ao fim de 12 meses a média foi de 44.8. Parece, assim, que a deterioração motora ao longo de um ano é independente do número de repetições CAG, o que teoricamente estaria relacionado com progressão mais rápida da doença. No entanto os doentes tinham estadios e tempo de doença diversos, pelo que não podemos inferir haver relação da expansão de repetições CAG com a evolução no espaço de um ano.

### IV.3.2. Pridopidina

Em Fevereiro de 2009 iniciámos um estudo com dez doentes, em estadios 2 e 3 de Shoulson, num ensaio de fase III, multicentrico, utilizando a substância pridopidina, um modulador dopaminérgico (206). Este ensaio conhecido como *MermaiHD* incluiu 437 doentes, randomizados em vários centros europeus e demonstrou que a pridopidina melhora a função motora na DH, particularmente os movimentos voluntários e com benefício ainda sobre alguns movimentos involuntários. O ensaio durou 26 semanas e os doentes foram divididos em dois braços: um em que a dose administrada foi de 45 mg uma vez por dia e o outro em que a dose de 45mg foi administrada duas vezes ao dia. A eficácia verificou-se no braço que fazia duas tomas por dia. Apesar destes resultados promissores, a avaliação dos nossos doentes ao fim de um ano de prossecução do tratamento, então já em fase aberta, não confirmou esta melhoria.

A média do *score* motor na nossa série, no início do tratamento foi de 42.6, sendo ao fim de um ano de 46.5. Os doentes apresentaram poucos efeitos adversos, não levando à interrupção do tratamento em nenhum deles, e referindo melhoria subjectiva que se objectivava de forma modesta aos seis meses de avaliação, mas não sustentada aos 12 meses. Se, por um lado, alguns movimentos involuntários melhoraram, nomeadamente a coreia segmentar e do tronco, a ocorrência de rigidez, as alterações posturais e da marcha fizeram deteriorar o *score* motor total.

Em conclusão, até ao momento nenhuma terapêutica dirigida ao sistema dopaminérgico é suficientemente eficaz no controlo das perturbações do movimento da DH.

### IV.3.3. Memantina

A memantina é um antagonista do receptor N-metil-D-aspartado (NMDA) não competitivo. Na DH a toxicidade pelo glutamato é um dos mecanismos reconhecidamente implicados não só na neurodegenerescência como também na própria gênese do movimento alterado, a coreia. A inibição do glutamato reduz a preproencefalina que está associada a movimentos hipercinéticos particularmente coreicos. Este é o fundamento teórico para a utilização da memantina em doentes com DH, depois do seu mecanismo de acção ter sido detalhadamente avaliado, em estudos que precederam a sua experimentação nas doenças neurodegenerativas (207).

103

Utilizámos este fármaco em 14 doentes, em vários estadios de doença, sendo único critério de utilização a decisão médica. Foi utilizado num estudo aberto, em associação com a polimedicação a que os doentes estão submetidos. A dose foi titulada até 20mg/dia e avaliámos os doentes aos três e seis meses de tratamento. Em 6 doentes a dose utilizada não ultrapassou os 10 mg/dia, por intolerância e agravamento sintomático. Durante este período de avaliação a terapêutica concomitante manteve-se inalterada na maioria dos casos.

A avaliação foi a padronizada para as visitas regulares, utilizando a UHDRS. Os resultados merecem apenas um comentário atendendo ao pequeno número de doentes tratados, e à difícil apreciação de eficácia de um fármaco tendo em conta a vasta medicação associada. No entanto, com 20 mg, os doentes melhoraram aos três meses o *score* motor e comportamental. A avaliação cognitiva foi feita aos seis meses e nesta não encontramos qualquer alteração. Os doentes toleraram bem o fármaco, tendo surgido efeitos secundários que levaram à suspensão em 4 doentes.

A memantina está aprovada para o tratamento da Demência de Alzheimer (208), tendo uma função inibitória da fosforilação da proteína tau em associação à função glutamatérgica. Vários modelos animais demonstraram modificação com a memantina inclusivamente um modelo de DH, podendo ser o mecanismo descrito o que está na origem da sua acção na melhoria cognitiva. A memantina não estimula a libertação dopaminérgica e tem menor acção anticolinérgica o que constituem vantagens sobre outros agentes inibidores dos receptores NMDA, nomeadamente a amantadina, potente anticolinérgico e como tal passível de agravar a coreia e a função cognitiva.

Não sendo objectivo deste trabalho a avaliação terapêutica porque os fármacos utilizados nesta amostra foram variados, utilizados em associação e principalmente porque existiram poucos períodos em que se manteve um

fármaco em dose estável, apenas fazemos um comentário à polimedicação utilizada.

Todos os doentes, sem excepção, estão ou estiveram sob terapêutica neuroléptica. Nesta amostra o haloperidol e a risperidona são, desta classe de fármacos, os mais utilizados.

104

Apesar de largamente usados tanto para o tratamento das manifestações psicóticas como para o tratamento da coreia, não existem estudos controlados versus placebo, que avaliem a eficácia dos anti-psicóticos na DH. Nenhum dos neurolépticos clássicos provou eficácia anti-coreia. Existe um pequeno estudo de avaliação da eficácia do haloperidol em 10 doentes que demonstrou uma redução superior a 30% nos movimentos coreicos, utilizando doses entre 1.5 e 10mg por dia (209). O risco dos efeitos tardios desta terapêutica, discinésia tardia, acatísia e apatia, não têm sido quantificados e são complicações dos depletors dopaminérgicos que podem ser particularmente problemáticas nos doentes com DH. Os antipsicóticos atípicos, porque têm menos efeitos secundários e superior tolerabilidade, têm sido utilizados na DH. A risperidona, apesar de muito usada, não tem a sua utilização fundamentada em nenhum estudo controlado e publicado. A sua eficácia tem sido descrita em casos isolados. Existe um ensaio com a olanzapina que também evidenciou redução nos sintomas coreicos (210). A clozapina usada até 150 mg dia, apesar de eficaz, demonstrou diversos efeitos secundários, desde sonolência a manifestações anticolinérgicas com agravamento na marcha. A quetiapina tem sido tentada, existindo ensaios, não randomizados e não controlados abrangendo um pequeno número de doentes, com resultados de sucesso variável (211). Mais recentemente tem sido utilizado o aripripazole, um anti-psicótico de segunda geração por apresentar um perfil de acção particular que lhe confere maior segurança. Actua como agonista parcial dos receptores dopaminérgicos D2 e serotoninérgicos 5HT1A, e como antagonista dos receptores 5HT2A, o que lhe confere excelente tolerabilidade e menor sonolência. No entanto, não apresenta benefício sobre os outros antipsicóticos, tendo risco sobreponível de ocorrência de discinésia tardia (212).

Os anti-depressivos são utilizados sem particular preferência por nenhuma das classes pelo que não é possível inferir qualquer conclusão sobre maior ou menor eficácia de algum grupo sobre outro.

Em 2007 foi publicado um estudo utilizando a sertralina, um bloqueador selectivo do *reuptake* da serotonina, num modelo animal de DH (R6/2 HD). Em estudos prévios fora demonstrado que a patogenia da doença é também mediada pela redução dos factores neurotróficos - *Brain Derived Neurotrophique*

*Factors* (BDNF). Os bloqueadores da recaptação da serotonina podem aumentar os níveis de BDNF, incrementando assim a neurogênese. Este estudo demonstrou que a sertralina aumentou a performance motora e prolongou a sobrevivência no modelo animal. Verificou-se também um aumento da neurogênese e aumento dos níveis de BDNF dos cérebros dos animais tratados com sertralina. Concluiu-se pelo efeito neuroprotector da sertralina num modelo animal, não existindo estudos sobreponíveis no humano.

Apesar de intensa investigação e do extraordinário avanço no conhecimento dos mecanismos celulares envolvidos na patogénese da DH, não existe, até ao momento, qualquer terapêutica neuroprotectora ou modificadora do curso da doença. Assim sendo, o tratamento é puramente sintomático, e a terapêutica seleccionada em cada momento dependente da manifestação clínica dominante ou mais incomodativa. A variedade de sintomas é grande, a coreia é o mais comum dos movimentos involuntários mas distonia, mioclonias, tiques ou parkinsonismo são habituais e necessitam abordagens terapêuticas diferentes. Como já referido, as manifestações psiquiátricas e comportamentais são frequentes nesta amostra, sendo as mais comuns a irritabilidade, a ansiedade e a depressão, sintomas que trazem incapacidade e necessitam de tratamento. Muitas terapêuticas são utilizadas, mas não existem estudos duplamente cegos e suficientemente longos que forneçam evidências suficientes para permitir estabelecer recomendações terapêuticas.

#### IV.4. Qualidade de vida na DH

A Organização Mundial de Saúde define qualidade de vida (QV) como “a percepção do indivíduo da sua posição na vida no contexto da cultura e sistema de valores nos quais vive e em relação aos seus objectivos, expectativas, padrões e preocupações...” (213).

O bem-estar físico e psicossocial de doentes com DH está comprometido quer pelas alterações motoras, quer pela disfunção cognitiva ou comportamental que acompanham a doença (214), sendo o primeiro objectivo de qualquer intervenção terapêutica a melhoria da qualidade de vida do doente e da sua família. Conhecendo-se muito pouco sobre a percepção subjectiva que os doentes têm sobre a sua qualidade de vida, foi objectivo deste estudo avaliá-la, o que foi feito em 23 doentes consecutivamente observados em consulta. Excluímos a existência de deterioração cognitiva utilizando o Mini-Mental State-Examination (MMS), como teste rápido de rastreio de demência. Na avaliação da qualidade de vida foram valorizadas as respostas obtidas na

aplicação do SF-36, um questionário genérico constituído por 36 itens, descrito na secção de material e métodos. Este questionário é auto-administrado pelos doentes. Os resultados que obtivemos nesta pequena amostra são semelhantes aos reportados noutros estudos que avaliam a QV na doença (129).

106

As dimensões da qualidade de vida (física e mental) encontram-se afectadas nos doentes com DH e as pontuações nestas escalas são inferiores às de uma população normal. Para melhorar a dimensão física da qualidade de vida é importante valorizar os tratamentos actualmente disponíveis, incluindo abordagens de reabilitação funcional. Alguns autores, entre eles, Busse (215), concluíram que existe uma subutilização de serviços de terapia física no tratamento de DH, particularmente em estadios iniciais, e que o controlo das quedas e do défice de mobilidade é um tratamento chave nestes doentes.

Existem estudos recentes (129, 214) que mostram a influência dos sintomas psiquiátricos na QV dos doentes, sendo estes os que mais a prejudicam, nomeadamente a depressão que é o factor preditivo mais importante da deterioração de qualidade de vida na DH. Outros estudos, como o de Ready e colaboradores (216), defendem que os sintomas neuropsiquiátricos não estão significativamente associados à qualidade de vida, nesta doença.

No nosso estudo, o *score* da componente comportamental da UHDRS segundo o coeficiente de Spearman não se correlacionou significativamente com nenhuma das dimensões da qualidade de vida dos doentes. No entanto, a depressão estava presente em cerca de 70% dos doentes e 78% tomavam medicação anti-depressiva. A depressão é responsável por défices físicos, dependência nas actividades de vida diária, limitações na participação social e alteração nas perspectivas para o futuro. O apoio e o suporte da família e dos amigos são essenciais, assim como o apoio social, promovendo uma melhor adaptação psicossocial e aumentando a adesão ao tratamento (217).

Os resultados demonstram que as alterações motoras e capacidades cognitivas influenciam sobretudo a dimensão física da qualidade de vida e em menor grau a função social. No entanto, a capacidade funcional é o principal determinante da qualidade de vida (física e mental), como sugerem os resultados dos estudos que mostraram que a capacidade funcional se correlaciona significativamente com a Função Física (FF), o Desempenho Físico (DF), a Saúde em Geral (SG) e a Função Social (FS). Ready e colaboradores (216) concluíram que as alterações funcionais e de capacidades cognitivas têm grande influência na qualidade de vida dos doentes com DH. Ho e colaboradores (129) encontraram uma associação estatisticamente significativa entre CFT e as dimensões físicas e mentais do SF-36, concluindo

que os factores-chave para a qualidade de vida em doentes com DH são a incapacidade funcional e também as alterações depressivas.

Um facto interessante que também deve ser tido em consideração é que níveis maiores de qualidade de vida podem estar associados a uma menor percepção da doença e das suas consequências por parte destes doentes (218).

107

Em conclusão, a qualidade de vida nos doentes desta amostra encontra-se diminuída, devido sobretudo ao compromisso da capacidade funcional. Para que possa ser melhorada é necessária uma intervenção global que inclua assistência médica, fisioterapia, educação e suporte psicossocial não só do doente como da sua família.

As limitações deste estudo são a dimensão reduzida da amostra e o facto de seleccionarmos como critério de inclusão doentes com MMSE normal o que pode ter criado um viés de referência. Esta selecção foi necessária para a valorização das respostas dos doentes, atendendo a que a avaliação se centra num questionário de auto preenchimento.

#### IV.5. Disfunção mitocondrial

Um dos mecanismos propostos para a morte neuronal nas doenças neurodegenerativas é a disfunção mitocondrial, existindo um número suficiente de evidências que provam o seu envolvimento na patogénese da DH. O mecanismo de falência energética foi, desde cedo, relacionado com a acentuada perda de peso que ocorre nos doentes, sendo esta atribuída a uma alteração precoce na cadeia respiratória mitocondrial e consequente deficiência no fornecimento energético da célula (219). Por outro lado, também a tomografia de emissão de positrões revelou, na DH, uma diminuição da utilização da glicose no estriado precedendo a atrofia dessa área cerebral, o que põe em evidência o baixo consumo energético dessa região (220). Vários estudos demonstraram que estas alterações ocorrem antes do início dos sintomas clínicos, sugerindo que a disfunção mitocondrial e consequente défice energético desempenha um papel importante na patogénese da doença (221, 222). Desde muito cedo se procuraram alterações morfológicas e funcionais nas mitocôndrias cerebrais e, em 1974, surgiu a primeira referência ao *deficit* na enzima succinato desidrogenase encontrado no núcleo caudado e no córtex de cérebros de doentes estudados post-mortem (223). Desde então sucederam-se estudos confirmando a redução da actividade do complexo II no núcleo caudado, do complexo III no núcleo caudado e putamen, e do

complexo IV no putamen de doentes com DH (224, 225). Estes resultados foram, no entanto, valorizados com alguma prudência porque correspondiam a determinações efectuadas em cérebros de doentes em estadios de doença avançada, com atrofia estriatal marcada, pelo que as alterações referidas poderiam resultar do intenso processo de morte glial e neuronal.

108

Estudos em modelos animais têm confirmado o papel da disfunção mitocondrial na patogénese da DH. A administração por via sistémica de ácido 3-nitropropiónico (3-NP), inibidor irreversível do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial, produz em ratos e primatas degenerescência electiva do estriado, com envolvimento dos neurónios espiculados de tamanho médio, o que se traduz clinicamente na ocorrência de movimentos anormais e défice cognitivo com particular alteração na função executiva (226). A ingestão accidental do 3-NP no humano, num caso reportado na literatura, produziu lesões selectivas nos gânglios da base com movimentos distónicos generalizados, sintomas semelhantes aos observados na DH (227). Ficou também demonstrado que uma alteração energética induzida pelo 3-NP em modelos primatas não humanos e roedores pode replicar as características clínicas e patofisiológicas da DH nestes animais, incluindo o desenvolvimento de movimentos coreiformes, alterações cognitivas progressivas e a degenerescência do estriado (228).

As mitocôndrias estriatais contêm mais ciclofilina-D do que as mitocôndrias corticais e são mais sensíveis à permeabilidade induzida pelo cálcio (229), nomeadamente através da abertura do poro da membrana mitocondrial, designado poro de permeabilidade transitória (permeability transition pore, mPTP). Atendendo a que as principais alterações patológicas da doença surgem no estriado, a conhecida vulnerabilidade desta área cerebral parece estar relacionada com o aumento da permeabilidade das mitocôndrias estriatais e conseqüente desregulação na entrada de cálcio intra-celular. A huntingtina mutada reage directamente com a membrana mitocondrial, facto evidenciado com microscopia electrónica. A disfunção mitocondrial é manifesta em dois modelos animais de DH, o ratinho knock-in 150/150, e o ratinho R6/2. Nestes dois modelos, as mitocôndrias demonstraram uma sensibilidade aumentada à abertura do mPTP induzida pelo cálcio e uma redução significativa em aconitase, enzima do ciclo de Krebs, com diminuição da actividade do complexo IV, quer no estriado quer no córtex cerebral. Provou-se ainda que esta deficiência precede a morte neuronal no modelo R6/2, parecendo, por isso, ser a sua causa (230).

Estudos recentes em linfoblastos de doentes com DH revelaram aumento da despolarização mitocondrial em relação aos controlos quando estas células

foram submetidas à acção de toxinas que exercem o seu efeito sobre o complexo II e IV, demonstrando uma susceptibilidade aumentada aos estímulos indutores de apoptose (231).

Por outro lado, a nível dos tecidos periféricos, encontrou-se diminuição da produção de lactato no músculo dos doentes com DH (232). As mitocôndrias de células que expressam a htt mutada demonstram diminuição do potencial de membrana, defeito na homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  com aumento da susceptibilidade à permeabilidade induzida pelo  $\text{Ca}^{2+}$  (233).

109

Nos doentes em estadios avançados da doença, a actividade dos complexos II, III e IV da cadeia mitocondrial de transporte de electrões encontra-se marcada e selectivamente reduzida nos núcleos caudado e putamen, sugerindo que a redução na fosforilação oxidativa cerebral é importante na patogénese da doença. Também em tecidos periféricos, particularmente no tecido muscular, foi demonstrado o compromisso da actividade enzimática do complexo I nos doentes com DH (234).

Foi de igual modo demonstrado que a huntingtina mutada, localizada dentro do núcleo, interage directamente com os factores de transcrição nucleares e co-factores, contribuindo para a toxicidade celular (235). Os agregados proteicos originam alterações no tráfego das mitocôndrias no que é o seu normal fluxo, fazendo com que se acumulem junto a esses agregados, tornando-se imóveis e funcionalmente inactivas. A huntingtina mutada interage deste modo directamente com as mitocôndrias alterando os mecanismos de tráfego mitocondrial e consequente disfunção neuronal (236).

Todas estas evidências vêm demonstrar o importante papel da mitocôndria na patogénese da doença.

No trabalho que aqui apresentamos, usando cíbridos como modelo celular de investigação, demonstrámos a existência primária de alterações em vias metabólicas mitocondriais.

Existem vários modelos de investigação laboratorial direccionados ao estudo da disfunção mitocondrial, sendo o modelo celular fornecido pelo cíbridos de doentes versus cíbridos de controlos saudáveis a técnica que utilizamos. Cíbridos são sistemas citoplasmáticos híbridos, produzidos através da fusão de células humanas de teratocarcinomas às quais foi extraído todo o DNA mitocondrial (células rho-0 NT2), com plaquetas de doentes HD (237). Este modelo permite estudar isoladamente as alterações provenientes das mitocôndrias do doente.

Em trabalhos anteriores já demonstramos que os cíbridos dos doentes apresentam maior vulnerabilidade ao *stress* oxidativo induzido pelo ácido 3-NP, aumento da libertação de citocromo c e morte celular em comparação com os cíbridos dos controlos saudáveis (131). Neste trabalho demonstramos agora que a produção endógena de ATP nos cíbridos de doentes é maior que nos cíbridos dos controlos saudáveis e que para além disso, esta diferença é parcialmente revertida quando os cíbridos são expostos ao 3-NP, ocorrendo então uma diminuição nos níveis endógenos de ATP, observada apenas nos cíbridos dos doentes e não nos cíbridos dos controlos. Esta diminuição de ATP pode estar relacionada com o aumento da morte celular por apoptose originada pela exposição ao 3-NP. Também demonstramos que nos cíbridos dos doentes não existe alteração nas enzimas dos complexos I-IV da cadeia respiratória mitocondrial, mas existe uma ligeira diminuição no potencial de membrana mitocondrial em comparação com os cíbridos dos controlos. Verificamos também que o aumento nos níveis de ATP se correlaciona com o aumento na razão lactato/piruvato e que esta relação diminuiu se for inibida a via da glicólise. Isto traduz um aumento no metabolismo glicolítico observado nos cíbridos dos doentes. Ainda nestas mesmas condições as mitocôndrias continuam a suportar a formação de ATP. As alterações no metabolismo energético resultantes do compromisso da metabolização da glicose nos doentes com DH têm sido comprovadas pela existência de níveis elevados de lactato no estriado e no córtex cerebral de doentes (238). Do mesmo modo já foi demonstrado o aumento da relação lactato/piruvato no liquor de doentes, acompanhando uma diminuição do metabolismo da glicose nas células astrocitárias estriatais, com preservação do metabolismo do oxigénio alterações estas, que se detectam em fases precoces da doença (239). Neste trabalho verificamos que a actividade da G-6PD, uma enzima chave na via das pentoses, está diminuída nos cíbridos dos doentes, sugerindo que a metabolização da glicose se faz através da via glicolítica. Observamos que ocorre significativa redução na produção total de ATP nos cíbridos dos doentes quando inibimos a glicólise. Embora os níveis de fosfocreatina sejam semelhantes entre os cíbridos de doentes e controlos, a inibição da glicólise aumentou significativamente o consumo de fosfocreatina nos cíbridos de doentes. A hidrólise da fosfocreatina pode compensar o decréscimo em ATP intracelular, dado que pode funcionar como uma fonte energética alternativa. No entanto, ao inibir-se a formação de ATP mitocondrial pela oligomicina, os níveis de fosfocreatina não sofreram alteração. Estudos prévios já tinham demonstrado um decréscimo na relação fosfocreatina/fosfato, no músculo dos doentes em comparação com os controlos (232), e também um atraso na recuperação dos níveis de fosfocreatina em resposta ao exercício físico (240). Por outro lado, o suplemento em piruvato com que as células foram tratadas, não fez aumentar a produção de ATP nos cíbridos dos doentes. Estando a

glicólise inibida, esperar-se-ia, nestas condições, que o piruvato estimulasse a actividade mitocondrial, como já demonstrado (241, 242). Verificamos ainda que a relação NADH/NAD mitocondrial, parâmetro que reflecte o estado redox da mitocôndria, está diminuída nos híbridos dos doentes, traduzindo uma alteração na função mitocondrial a um nível que antecede a fosforilação oxidativa.

A nível mitocondrial a produção de NADH está dependente da actividade das desidrogenases, tais como a piruvato-desidrogenase, e outras desidrogenases do ciclo de Krebs. Neste trabalho encontramos uma diminuição significativa na actividade da PDH nos híbridos dos doentes. No entanto, a actividade da alfacetoglutarato-desidrogenase encontra-se aumentada, o que pode sugerir um mecanismo compensatório que tenta contrabalançar a diminuição na produção de NADH através da piruvato-desidrogenase. As desidrogenases mitocondriais são enzimas altamente reguladoras cuja actividade é afectada quer pela disponibilidade dos substratos e cofactores, quer por expressão enzimática alterada.

O decréscimo da actividade da piruvato-desidrogenase já foi observado no caudado e putamen de doentes com DH (243), e correlaciona-se com o tempo de duração da doença (244). Também já foi demonstrado que a piruvato desidrogenase está diminuída no estriado de ratinhos transgénicos R6/2, e que esta diminuição parece relacionar-se com a idade do animal (245).

Neste estudo encontramos também aumento dos níveis de glutamato mitocondrial, acompanhando níveis normais de aspartato, o que poderá ser consequência dum aumento na síntese, no metabolismo ou no transporte do glutamato. Este aumento é improvável que provenha da conversão do aspartato em glutamato por transaminação ou da conversão da glutamina em glutamato por desamidação uma vez que não detectamos alteração dos níveis de aspartato e glutamina nos híbridos dos doentes. Encontramos uma diminuição da alanina mitocondrial, o que sugere um aumento na actividade da alanina-transaminase. Na realidade o glutamato mitocondrial é utilizado pela alanina-aminotransferase (na matrix mitocondrial) para produzir o piruvato, através da conversão da alfacetoglutarato e alanina em glutamato e piruvato.

Estes resultados estão em concordância com os trabalhos de Koroshetz (238), que encontrou uma diminuição de alanina, e dos níveis de piruvato no líquido cefalorraquídeo de doentes com DH, acompanhando um aumento da razão lactato /piruvato.

A diminuição de alanina mitocondrial pode corresponder a uma tentativa de repor os níveis de alfacetogluturato e assim também do NADH mitocondrial, e pode explicar o aumento de glutamato que observamos em condições experimentais.

**112**

Em conclusão: os híbridos provenientes de doentes com DH apresentam intrínsecas alterações bioenergéticas resultantes da disfunção das mitocôndrias. Esta disfunção surge como consequência da alteração na actividade enzimática do complexo da piruvato-desidrogenase, precedendo a fosforilação oxidativa e afectando também o fluxo metabólico de aminoácidos. A principal consequência deste distúrbio é a deficiente produção do ATP, e consequente falência energética celular.

# CAPÍTULO V

## CONCLUSÕES

Este trabalho expressa a experiência de dez anos de acompanhamento de doentes com DH e pretende descrever as características de uma população de doentes afectados por uma doença neurodegenerativa, crónica e progressiva, para a qual não existe qualquer terapêutica curativa ou neuroprotectora que trave o seu curso inexorável.

Os resultados aqui apresentados referem-se a uma amostra da zona centro de Portugal, cuja origem permitiu identificar alguns nichos geográficos onde se constata maior prevalência da doença. O tempo decorrido fez com que coexistam elementos de duas, por vezes três gerações, facultando-nos informação clínica suficiente e material biológico para a prossecução de várias linhas de investigação.

No estudo longitudinal, os participantes foram sujeitos à mesma bateria de escalas de avaliação, em dois momentos distintos, separados de um ano. Este estudo incidiu sobre uma população com doença manifesta, e também sobre os portadores da mutação patogénica mas ainda numa situação pré-clínica, sem manifestações motoras da doença, apelidados de preditivos positivos.

Para além da apresentação dos resultados e da interpretação do trabalho em curso esboçamos também algumas linhas de investigação futura.

### V.1. Epidemiologia

Pela análise da distribuição geográfica da doença concluímos que dos 168 indivíduos desta amostra, 18 doentes pertencem a famílias originárias de S Frutuoso (Montemor-o-Velho); 8 são de Oliveira de Azeméis e 7 de Seia. A identificação de focos de doença indiciou a existência de um fundador comum em cada um destes núcleos. A partir da recolha exaustiva da informação sobre

todos os doentes e familiares em risco destas famílias, o que não foi feito, pretendemos lançar as bases para um estudo epidemiológico. Sendo considerada uma doença rara, não existem estudos para a população portuguesa que permitam caracterizar a sua dimensão entre nós, facto que reportamos de particular importância.

### V.2. Diagnóstico genético

Concluimos que, nesta população, o valor médio da expansão do trinucleótido CAG é de 43.5 repetições e, quanto maior o número de repetições CAG, mais precoce a idade de início dos sintomas. No entanto, esta relação foi responsável por apenas 45.9% da variância na idade de início, pelo que a acção de genes modificadores parece ter aqui um papel importante. O passo seguinte seria, nas famílias que possuem pelo menos três elementos afectados e cobrem duas gerações, investigar a acção de genes modificadores, nomeadamente do gene codificador do PGC-1 $\alpha$ , um regulador transcricional mitocondrial e já identificado como interferindo no curso da doença. Identificámos 14 famílias com mais de três elementos afectados e verificámos que a distribuição do número de repetições CAG dentro de cada família não é aleatória, existindo diferenças significativas entre elas. Falta investigar que factores condicionam as diferenças fenotípicas dentro dos elementos da mesma família, nomeadamente no que diz respeito à idade de início e características dos sintomas inaugurais. Sintomas estes, que ditam o momento crucial de passagem de um indivíduo de um estadio de preditivo positivo, portador assintomático, pré-clínico, pré-sintomático, *expansion-positive*, a Doente.

Concluimos também que em 4.5% dos indivíduos com um teste preditivo positivo o alelo expandido é de classe 3, isto é de penetrância incompleta, com um número de repetições CAG entre 36 – 39 e instabilidade meiótica. Interessa acompanhar a evolução destes indivíduos e perceber se a sua progressão será ou não mais benigna que os restantes indivíduos preditivos positivos e doentes que apresentam um alelo com penetrância completa.

### V.3. Apatia

A apatia é frequente, antecedendo os sintomas motores da doença. A sua presença nos indivíduos em risco confere, como vimos, uma forte probabilidade de se tratar de portadores da mutação. A apatia como

manifestação clínica traduz-se numa marcada redução nos comportamentos direccionados, determinados pela vontade, guiados por um objectivo, e indica uma alteração nos circuitos pré-frontais de ligação aos gânglios da base, circuitos que estão relacionados com os comportamentos voluntários. Considera-se que a apatia tem uma componente cognitiva, emocional e comportamental, estando estas categorias associadas a diferentes substratos anatómicos. A componente emocional da apatia traduz disfunção do circuito orbito-frontal e medial, de ligação ao estriado ventral, circuito considerado essencial nos mecanismos de recompensa. A componente cognitiva da apatia usa o circuito frontal dorso-lateral, que se projecta na porção dorsal do núcleo caudado, e serve os comportamentos voluntários, direccionados, com objectivo.

Ao concluirmos que a apatia é um sintoma frequente nos indivíduos pré-sintomáticos, podemos considerar que estes circuitos estão precocemente alterados na DH. Neste momento, grupos de investigação procuram criar instrumentos que permitam avaliar estas componentes, sendo este um dos campos que pretendemos aprofundar. Como investigação futura, nestes indivíduos pré-sintomáticos que identificámos com apatia, é nosso objectivo realizar ressonância funcional para melhor conhecer o substrato anatómico destas alterações.

Do mesmo modo será a disfunção destes circuitos que está em causa no processamento da aprendizagem implícita, pelo que esta será também uma linha de investigação futura.

Verificamos ainda, na nossa amostra, que a apatia se correlaciona com a deterioração cognitiva e com o declínio funcional, não se correlacionando com a existência de depressão. Estes resultados reforçam a convicção de que apatia e depressão são dimensões distintas.

#### **V.4. Evolução da doença**

Ao fim de um ano de evolução a deterioração motora da doença foi marcada, enquanto no aspecto comportamental e cognitivo o intervalo de um ano não é suficiente para detectar grandes variações. Concluimos que a marcha é um dos sintomas motores que sofre maior alteração com a evolução da doença, condicionando marcada incapacidade. Tem múltiplas componentes, necessitando de maior intervenção terapêutica, não necessariamente farmacológica, uma vez que é uma das manifestações da doença que expressa

pior resposta a qualquer um dos grupos terapêuticos que utilizamos. A marcha está comprometida quer pela coreia dos membros inferiores, quer pela impersistência no acto motor voluntário, quer ainda pela presença de variações do tonus com alternância entre hipertonia e hipotonia. Estas alterações interferem com a manutenção da postura e são responsáveis pelas quedas frequentes que os doentes sofrem. A terapêutica farmacológica nesta situação é ineficaz, pelo que o desenvolvimento de adequados programas de fisioterapia tem aqui toda a indicação.

Constatamos ainda, dentro da avaliação motora dos doentes, que os movimentos oculares sofrem marcada alteração em apenas um ano de evolução. Mais acentuada é a alteração nas sacadas verticais, o que sugere que o substrato anatómico desta função se localiza nas áreas cerebrais mais precocemente afectadas pelo processo de neurodegenerescência. O auxílio da imagiologia funcional e volumetria poderá trazer também aqui algum esclarecimento.

### V.5. Terapêuticas utilizadas

Nenhuma terapêutica é sustentadamente eficaz. O grande interesse no reconhecimento dos sinais iniciais de doença e na procura de biomarcadores, reside na possibilidade de muito precocemente se submeterem os doentes a substâncias neuroprotectoras ou neuromodeladoras, objectivo este, até ao momento não conseguido.

### V.6. Qualidade de Vida

A qualidade de vida está alterada nos doentes e, independentemente do estadio em que se encontram, estes têm a percepção dessa perturbação. Os resultados deste estudo demonstram que as alterações motoras e das capacidades cognitivas influenciam sobretudo a dimensão física da qualidade de vida. Em menor grau é a função social, de seguida, a sofrer a influência dessas alterações. No entanto, a capacidade funcional é o principal determinante da qualidade de vida (física e mental). Outras avaliações se impunham para complemento desta investigação, nomeadamente a avaliação da percepção que os prestadores de cuidados têm da qualidade de vida dos doentes, estudo este neste momento em curso.

### **V.7. Disfunção Mitocondrial**

A disfunção mitocondrial surge precocemente e constitui um dos mecanismos implicados na patogenia da doença. No modelo celular que utilizámos - híbridos de doentes com DH - encontramos um aumento nos níveis de ATP, bem como um incremento na via glicolítica com consequente aumento da relação lactato/piruvato a nível celular. Encontrámos também uma diminuição na actividade enzimática da glicose-6-fosfato desidrogenase, o que pode indiciar uma diminuição da via das pentoses. Quando inibida a via glicolítica os níveis de ATP diminuíram, o que se acompanhou de um aumento da fosfocreatina nos híbridos HD. O fornecimento de piruvato não fez aumentar os níveis de ATP, nem a fosfocreatina, sugerindo deste modo uma alteração inicial na mitocôndria que a impede de utilizar o seu normal substrato.

117

Ao concluirmos que existe disfunção mitocondrial com alteração nas vias metabólicas nos híbridos dos doentes com DH, pensamos que se devem eleger novos alvos terapêuticos, e sobre eles direccionar a investigação de distintas estratégias terapêuticas.



# CAPÍTULO VI

## BIBLIOGRAFIA

1. Harper B. Huntington disease. *J R Soc Med.* 2005 Dec;98(12):550.
2. Osler W. Historical note on hereditary chorea. *Neurographs.* 1908(1):113-6.
3. Huntington G. On chorea. George Huntington, M.D. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2003 Winter;15(1):109-12.
4. DeJong RN. The History of Huntington's Chorea in the United States of America. *Adv Neurol.* 1973(1):19-27.
5. Lanska DJ. George Huntington (1850-1916) and hereditary chorea. *J Hist Neurosci.* 2000 Apr;9(1):76-89.
6. Lanska DJ. Chapter 33 The history of movement disorders. In: Michael J. Aminoff FB, Dick FS, editors. *Handbook of Clinical Neurology.* Elsevier; 2009. p. 501-46.
7. Okun MS. Huntington's disease: what we learned from the original essay. *Neurologist.* 2003 Jul;9(4):175-9.
8. Waters CO. Description of chorea. In: Dunglison R, editor. *Practice of Medicine.* Philadelphia, Pa: Lea & Blanchard; 1842. p. 312-3.
9. Heathfield KW. Huntington's chorea: a centenary review. *Postgrad Med J.* 1973 Jan;49(567):32-45.
10. Goetz CG, Chmura TA, Lanska DJ. Seminal figures in the history of movement disorders: Sydenham, Parkinson, and Charcot: Part 6 of the MDS-sponsored history of Movement Disorders exhibit, Barcelona, June 2000. *Mov Disord.* 2001 May;16(3):537-40.
11. Watson JD, Crick FH. The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1953;18:123-31.
12. Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature.* 1983 Nov 17-23;306(5940):234-8.
13. Okun MS, Thommi N, Americo Negrette (1924 to 2003): diagnosing Huntington disease in Venezuela. *Neurology.* 2004 Jul 27;63(2):340-3.
14. Bates G, Harper PS, Jones L. Huntington's disease. 3rd ed. Oxford ; New York: Oxford University Press; 2002.
15. Wexler NS, Conneally PM, Housman D, Gusella JF. A DNA polymorphism for Huntington's disease marks the future. *Arch Neurol.* 1985 Jan;42(1):20-4.
16. Wexler NS. The Tiresias complex: Huntington's disease as a paradigm of testing for late-onset disorders. *FASEB J.* 1992 Jul;6(10):2820-5.
17. Group HsDCR. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell.* 1993;72(6):971-83.
18. Bauer PO, Nukina N. The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies. *J Neurochem.* 2009 Sep;110(6):1737-65.
19. Paulsen JS, Hayden M, Stout JC, Langbehn DR, Aylward E, Ross CA, et al. Preparing for preventive clinical trials: the Predict-HD study. *Arch Neurol.* 2006 Jun;63(6):883-90.
20. Tabrizi SJ, Langbehn DR, Leavitt BR, Roos RA, Durr A, Craufurd D, 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 Sep;8(9):791-801.
21. Skaper SD, Giusti P. Transgenic mouse models of Parkinson's disease and Huntington's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2010 Aug;9(4):455-70.

22. Vonsattel JP. Huntington disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.* 2008 Jan;115(1):55-69.
23. Li SH, Li XJ. Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet.* 2004 Mar;20(3):146-54.
24. Schols L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T, Riess O. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol.* 2004 May;3(5):291-304.
25. Langbehn DR, Brinkman RR, Falush D, Paulsen JS, Hayden MR. A new model for prediction of the age of onset and penetrance for Huntington's disease based on CAG length. *Clin Genet.* 2004 Apr;65(4):267-77.
26. van der Burg JM, Bjorkqvist M, Brundin P. Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. *Lancet Neurol.* 2009 Aug;8(8):765-74.
27. Landles C, Bates GP. Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO Rep.* 2004 Oct;5(10):958-63.
28. Kaltenbach LS, Romero E, Becklin RR, Chettier R, Bell R, Phansalkar A, et al. Huntingtin interacting proteins are genetic modifiers of neurodegeneration. *PLoS Genet.* 2007 May 11;3(5):e82.
29. Zeitlin S, Liu JP, Chapman DL, Papaioannou VE, Efstratiadis A. Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat Genet.* 1995 Oct;11(2):155-63.
30. Gil JM, Rego AC. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur J Neurosci.* 2008 Jun;27(11):2803-20.
31. Ramadan N, Flockhart I, Booker M, Perrimon N, Mathey-Prevot B. Design and implementation of high-throughput RNAi screens in cultured *Drosophila* cells. *Nat Protoc.* 2007;2(9):2245-64.
32. Takahashi T, Katada S, Onodera O. Polyglutamine diseases: where does toxicity come from? what is toxicity? where are we going? *J Mol Cell Biol.* 2010 Aug;2(4):180-91.
33. Becher MW, Kotzuk JA, Davis LE, Bear DG. Intracellular inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy contain poly(A) binding protein 2. *Ann Neurol.* 2000 Nov;48(5):812-5.
34. DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, et al. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science.* 1997 Sep 26;277(5334):1990-3.
35. Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, Greenberg ME. Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell.* 1998 Oct 2;95(1):55-66.
36. Sapp E, Schwarz C, Chase K, Bhide PG, Young AB, Penney J, et al. Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients. *Ann Neurol.* 1997 Oct;42(4):604-12.
37. Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature.* 2004 Oct 14;431(7010):805-10.
38. Miller J, Arrasate M, Shaby BA, Mitra S, Masliah E, Finkbeiner S. Quantitative relationships between huntingtin levels, polyglutamine length, inclusion body formation, and neuronal death provide novel insight into huntingtin's disease molecular pathogenesis. *J Neurosci.* 2010 Aug 4;30(31):10541-50.
39. Osmand AP, Bertheliev V, Wetzel R. Imaging polyglutamine deposits in brain tissue. *Methods Enzymol.* 2006;412:106-22.
40. Weiss A, Klein C, Woodman B, Sathasivam K, Bibel M, Regulier E, et al. Sensitive biochemical aggregate detection reveals aggregation onset before symptom development in cellular and murine models of Huntington's disease. *J Neurochem.* 2008 Feb;104(3):846-58.
41. Graham RK, Deng Y, Slow EJ, Haigh B, Bissada N, Lu G, et al. Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell.* 2006 Jun 16;125(6):1179-91.
42. Humbert S, Bryson EA, Cordelieres FP, Connors NC, Datta SR, Finkbeiner S, et al. The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt. *Dev Cell.* 2002 Jun;2(6):831-7.
43. Warby SC, Doty CN, Graham RK, Shively J, Singaraja RR, Hayden MR. Phosphorylation of huntingtin reduces the accumulation of its nuclear fragments. *Mol Cell Neurosci.* 2009 Feb;40(2):121-7.
44. Colin E, Zala D, Liot G, Rangone H, Borrell-Pages M, Li XJ, et al. Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons. *EMBO J.* 2008 Aug 6;27(15):2124-34.

45. Ravache M, Abou-Sleymane G, Trottier Y. [Neurodegenerative polyglutamine expansion diseases: pathophysiology and therapeutic strategies]. *Pathol Biol (Paris)*. 2010 Oct;58(5):357-66.
46. Sun Y, Savanenin A, Reddy PH, Liu YF. Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. *J Biol Chem*. 2001 Jul 6;276(27):24713-8.
47. Han I, You Y, Kordower JH, Brady ST, Morfini GA. Differential vulnerability of neurons in Huntington's disease: the role of cell type-specific features. *J Neurochem*. 2010 Jun;113(5):1073-91.
48. Li LB, Yu Z, Teng X, Bonini NM. RNA toxicity is a component of ataxin-3 degeneration in *Drosophila*. *Nature*. 2008 Jun 19;453(7198):1107-11.
49. Riley BE, Orr HT. Polyglutamine neurodegenerative diseases and regulation of transcription: assembling the puzzle. *Genes Dev*. 2006 Aug 15;20(16):2183-92.
50. Bowman AB, Yoo SY, Dantuma NP, Zoghbi HY. Neuronal dysfunction in a polyglutamine disease model occurs in the absence of ubiquitin-proteasome system impairment and inversely correlates with the degree of nuclear inclusion formation. *Hum Mol Genet*. 2005 Mar 1;14(5):679-91.
51. Vonsattel JP, Myers RH, Bird ED, Ge P, Richardson EP, Jr. [Huntington disease: 7 cases with relatively preserved neostriatal islets]. *Rev Neurol (Paris)*. 1992;148(2):107-16.
52. Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP, Jr. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1985 Nov;44(6):559-77.
53. Vonsattel JP, DiFiglia M. Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1998 May;57(5):369-84.
54. Vonsattel JP, Keller C, Del Pilar Amaya M. Neuropathology of Huntington's disease. *Handb Clin Neurol*. 2008;89:599-618.
55. Vonsattel JPG, Keller C, Pilar Amaya Md. Neuropathology of Huntington's Disease. In: Charles D, Irene L, editors. *Handbook of Clinical Neurology*; Elsevier; 2008. p. 599-618.
56. Gomez-Tortosa E, MacDonald ME, Friend JC, Taylor SA, Weiler LJ, Cupples LA, et al. Quantitative neuropathological changes in presymptomatic Huntington's disease. *Ann Neurol*. 2001 Jan;49(1):29-34.
57. Hedreen JC, Peysner CE, Folstein SE, Ross CA. Neuronal loss in layers V and VI of cerebral cortex in Huntington's disease. *Neurosci Lett*. 1991 Dec 9;133(2):257-61.
58. Kloppel S, Henley SM, Hobbs NZ, Wolf RC, Kassubek J, Tabrizi SJ, et al. Magnetic resonance imaging of Huntington's disease: preparing for clinical trials. *Neuroscience*. 2009 Nov 24;164(1):205-19.
59. Selemon LD, Rajkowska G, Goldman-Rakic PS. Evidence for progression in frontal cortical pathology in late-stage Huntington's disease. *The Journal of Comparative Neurology*. 2004;468(2):190-204.
60. Myers RH, Vonsattel JP, Paskevich PA, Kiely DK, Stevens TJ, Cupples LA, et al. Decreased neuronal and increased oligodendroglial densities in Huntington's disease caudate nucleus. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1991 Nov;50(6):729-42.
61. DiFiglia M, Pasik P, Pasik T. A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res*. 1976 Sep 17;114(2):245-56.
62. Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci*. 1995 Dec;18(12):527-35.
63. Crossman AR, Mitchell IJ, Sambrook MA, Jackson A. Chorea and myoclonus in the monkey induced by gamma-aminobutyric acid antagonism in the lentiform complex. The site of drug action and a hypothesis for the neural mechanisms of chorea. *Brain*. 1988 Oct;111 ( Pt 5):1211-33.
64. Ferrante RJ, Kowall NW, Beal MF, Richardson EP, Jr., Bird ED, Martin JB. Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. *Science*. 1985 Nov 1;230(4725):561-3.
65. DiProspero NA, Chen EY, Charles V, Plomann M, Kordower JH, Tagle DA. Early changes in Huntington's disease patient brains involve alterations in cytoskeletal and synaptic elements. *J Neurocytol*. 2004 Sep;33(5):517-33.
66. Ross CA, Shoulson I. Huntington disease: pathogenesis, biomarkers, and approaches to experimental therapeutics. *Parkinsonism Relat Disord*. 2009 Dec;15 Suppl 3:S135-8.
67. Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, et al. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell*. 1997 Aug 8;90(3):537-48.

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 May;41(5):689-92.
69. Braak H, Braak E. Allocortical involvement in Huntington's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1992 Dec;18(6):539-47.
70. Sax DS ODB, Butters N, Menzer L, Montgomery K, Kayne H L. Computerized tomographic, neurologic, and neuropsychological correlates of Huntington's disease. *J Neurosci* 1983(18):21-36.
71. Reading SA, Dziorny AC, Peroutka LA, Schreiber M, Gourley LM, Yallapragada V, et al. Functional brain changes in presymptomatic Huntington's disease. *Ann Neurol.* 2004 Jun;55(6):879-83.
72. Paulsen JS, Magnotta VA, Mikos AE, Paulson HL, Penziner E, Andreasen NC, et al. Brain structure in preclinical Huntington's disease. *Biol Psychiatry.* 2006 Jan 1;59(1):57-63.
73. Rosas HD, Lee SY, Bender AC, Zaleta AK, Vangel M, Yu P, et al. Altered white matter microstructure in the corpus callosum in Huntington's disease: implications for cortical "disconnection". *Neuroimage.* 2010 Feb 15;49(4):2995-3004.
74. Solomon AC, Stout JC, Johnson SA, Langbehn DR, Aylward EH, Brandt J, et al. Verbal episodic memory declines prior to diagnosis in Huntington's disease. *Neuropsychologia.* 2007 Apr 9;45(8):1767-76.
75. Magnotta VA, Kim J, Kosciak T, Beglinger LJ, Espinso D, Langbehn D, et al. Diffusion Tensor Imaging in Preclinical Huntington's Disease. *Brain Imaging Behav.* 2009 Mar 1;3(1):77-84.
76. Seppi K, Schocke MF, Mair KJ, Esterhammer R, Weirich-Schwaiger H, Utermann B, et al. Diffusion-weighted imaging in Huntington's disease. *Mov Disord.* 2006 Jul;21(7):1043-7.
77. Hobbs NZ, Barnes J, Frost C, Henley SM, Wild EJ, Macdonald K, et al. Onset and progression of pathologic atrophy in Huntington disease: a longitudinal MR imaging study. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2010 Jun;31(6):1036-41.
78. Zimelman JL, Paulsen JS, Mikos A, Reynolds NC, Hoffmann RG, Rao SM. fMRI detection of early neural dysfunction in preclinical Huntington's disease. *J Int Neuropsychol Soc.* 2007 Sep;13(5):758-69.
79. Paulsen JS, Zimelman JL, Hinton SC, Langbehn DR, Leveroni CL, Benjamin ML, et al. fMRI biomarker of early neuronal dysfunction in presymptomatic Huntington's Disease. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2004 Nov-Dec;25(10):1715-21.
80. Nahab FB, Hallett M. Current role of functional MRI in the diagnosis of movement disorders. *Neuroimaging Clin N Am.* 2010 Feb;20(1):103-10.
81. Hennenlotter A, Schroeder U, Erhard P, Haslinger B, Stahl R, Weindl A, et al. Neural correlates associated with impaired disgust processing in pre-symptomatic Huntington's disease. *Brain.* 2004 Jun;127(Pt 6):1446-53.
82. Clark VP, Lai S, Deckel AW. Altered functional MRI responses in Huntington's disease. *Neuroreport.* 2002 Apr 16;13(5):703-6.
83. Georgiou-Karistianis N, Sriharan A, Farrow M, Cunnington R, Stout J, Bradshaw J, et al. Increased cortical recruitment in Huntington's disease using a Simon task. *Neuropsychologia.* 2007 Apr 9;45(8):1791-800.
84. Wolf RC, Sambataro F, Vasic N, Schonfeldt-Lecuona C, Ecker D, Landwehrmeyer B. Altered frontostriatal coupling in pre-manifest Huntington's disease: effects of increasing cognitive load. *Eur J Neurol.* 2008 Nov;15(11):1180-90.
85. Group HS. Unified Huntington's disease rating scale: reliability and consistency. *Mov Disord.* 1996(11):136-42.
86. Biglan KM, Ross CA, Langbehn DR, Aylward EH, Stout JC, Queller S, et al. Motor abnormalities in premanifest persons with Huntington's disease: the PREDICT-HD study. *Mov Disord.* 2009 Sep 15;24(12):1763-72.
87. Roos RA. Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5(1):40.
88. Haw C, Harwood D, Hawton K. Dementia and suicidal behavior: a review of the literature. *Int Psychogeriatr.* 2009 Jun;21(3):440-53.
89. Farrer LA. Suicide and attempted suicide in Huntington disease: implications for preclinical testing of persons at risk. *Am J Med Genet.* 1986 Jun;24(2):305-11.
90. Paulsen JS, Hoth KF, Nehl C, Stierman L. Critical periods of suicide risk in Huntington's disease. *Am J Psychiatry.* 2005 Apr;162(4):725-31.
91. Paulsen JS, Langbehn DR, Stout JC, Aylward E, Ross CA, Nance M, et al. Detection of Huntington's disease decades before diagnosis: the Predict-HD study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008 Aug;79(8):874-80.
92. Massman PJ, Delis DC, Butters N, Levin BE, Salmon DP. Are all subcortical dementias alike? Verbal learning and memory in Parkinson's and

- Huntington's disease patients. *J Clin Exp Neuropsychol.* 1990 Oct;12(5):729-44.
93. Almeida S, Sarmiento-Ribeiro AB, Januario C, Rego AC, Oliveira CR. Evidence of apoptosis and mitochondrial abnormalities in peripheral blood cells of Huntington's disease patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Oct 3;374(4):599-603.
94. Bjorkqvist M, Wild EJ, Thiele J, Silvestroni A, Andre R, Lahiri N, et al. A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *J Exp Med.* 2008 Aug 4;205(8):1869-77.
95. Chiang MC, Chen HM, Lee YH, Chang HH, Wu YC, Soong BW, et al. Dysregulation of C/EBPalpha by mutant Huntingtin causes the urea cycle deficiency in Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 2007 Mar 1;16(5):483-98.
96. Orth M, Cooper JM, Bates GP, Schapira AH. Inclusion formation in Huntington's disease R6/2 mouse muscle cultures. *J Neurochem.* 2003 Oct;87(1):1-6.
97. Walker FO. Huntington's disease. *Lancet.* 2007 Jan 20;369(9557):218-28.
98. Avila-Giron R. Medical and Social Aspects of Huntington's Chorea in the State of Zulia, Venezuela. In: Barbeau A CT, Paulson GW, editor. *Advances in Neurology.* New York: Raven Press; 1973. p. 261-6.
99. Pridmore SA. The large Huntington's disease family of Tasmania. *Med J Aust.* 1990 Nov 19;153(10):593-5.
100. Rubinsztein D. Molecular biology of Huntington's disease (HD) and HD-like disorders. In: Pulst S, editor. *Genetics of movement disorders.* California: Academic Press; 2003. p. 365-77.
101. Herishanu YO, Parvari R, Pollack Y, Shelef I, Marom B, Martino T, et al. Huntington disease in subjects from an Israeli Karaite community carrying alleles of intermediate and expanded CAG repeats in the HTT gene: Huntington disease or phenocopy? *J Neurol Sci.* 2009 Feb 15;277(1-2):143-6.
102. Kremer B, Goldberg P, Andrew SE, Theilmann J, Telenius H, Zeisler J, et al. A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N Engl J Med.* 1994 May 19;330(20):1401-6.
103. Sequeiros J, Ramos EM, Cerqueira J, Costa MC, Sousa A, Pinto-Basto J, et al. 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 Oct;78(4):381-7.
104. Goldberg YP, Kremer B, Andrew SE, Theilmann J, Graham RK, Squitieri F, et al. Molecular analysis of new mutations for Huntington's disease: intermediate alleles and sex of origin effects. *Nat Genet.* 1993 Oct;5(2):174-9.
105. Andrich J, Arning L, Wieczorek S, Kraus PH, Gold R, Saft C. Huntington's disease as caused by 34 CAG repeats. *Mov Disord.* 2008 Apr 30;23(6):879-81.
106. Wexler A. Stigma, history, and Huntington's disease. *Lancet.* 2010 Jul 3;376(9734):18-9.
107. Morrison PJ. Accurate prevalence and uptake of testing for Huntington's disease. *Lancet Neurol.* 2010 Dec 9(12):1147.
108. Spinney L. Uncovering the true prevalence of Huntington's disease. *The Lancet Neurology.* 2010;9(8):760-1.
109. Adam OR, Jankovic J. Symptomatic treatment of Huntington disease. *Neurotherapeutics.* 2008 Apr;5(2):181-97.
110. Phillips W, Shannon KM, Barker RA. The current clinical management of Huntington's disease. *Mov Disord.* 2008 Aug 15;23(11):1491-504.
111. Bonelli RM, Wenning GK. Pharmacological management of Huntington's disease: an evidence-based review. *Curr Pharm Des.* 2006;12(21):2701-20.
112. Mestre T, Ferreira J, Coelho MM, Rosa M, Sampaio C. Therapeutic interventions for symptomatic treatment in Huntington's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009(3):CD006456.
113. Mestre T, Ferreira J, Coelho MM, Rosa M, Sampaio C. Therapeutic interventions for disease progression in Huntington's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009(3):CD006455.
114. Frank S, Jankovic J. Advances in the pharmacological management of Huntington's disease. *Drugs.* 2010 Mar 26;70(5):561-71.
115. Moro E, Lang AE, Stafella AP, Poon YY, Arango PM, Dagher A, et al. Bilateral globus pallidus stimulation for Huntington's disease. *Ann Neurol.* 2004 Aug;56(2):290-4.
116. Bachoud-Levi AC. Neural grafts in Huntington's disease: viability after 10 years. *Lancet Neurol.* 2009 Nov;8(11):979-81.
117. Lorenzano C, Dirapoli L, Gilio F, Suppa A, Bagnato S, Curra A, et al. Motor cortical excitability studied with repetitive transcranial magnetic stimulation in patients with

- Huntington's disease. *Clin Neurophysiol.* 2006 Aug;117(8):1677-81.
118. Medina FJ, Tunes I. Huntington's disease: the value of transcranial magnetic stimulation. *Curr Med Chem.* 2010;17(23):2482-91.
119. Unified Huntington's Disease Rating Scale: reliability and consistency. Huntington Study Group. *Mov Disord.* 1996 Mar;11(2):136-42.
120. McHorney CA, Ware JE, Jr., Raczek AE. The MOS 36-Item Short-Form Health Survey (SF-36): II. Psychometric and clinical tests of validity in measuring physical and mental health constructs. *Med Care.* 1993 Mar;31(3):247-63.
121. Shoulson I, Fahn S. Huntington disease: clinical care and evaluation. *Neurology.* 1979 Jan;29(1):1-3.
122. Beglinger LJ, Langbehn DR, Duff K, Stierman L, Black DW, Nehl C, et al. Probability of obsessive and compulsive symptoms in Huntington's disease. *Biol Psychiatry.* 2007 Feb 1;61(3):415-8.
123. Marder K, Zhao H, Myers RH, Cudkovicz M, Kayson E, Kieburz K, et al. Rate of functional decline in Huntington's disease. Huntington Study Group. *Neurology.* 2000 Jan 25;54(2):452-8.
124. Munsat TL. Quantification of neurological deficit. Boston: Butterworths; 1989.
125. Stroop JRS. *J Exp Psychol.* 1935;18:643-62.
126. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 1975 Nov;12(3):189-98.
127. Hamilton M. A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1960 Feb;23:56-62.
128. Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry.* 1961 Jun;4:561-71.
129. Ho AK, Gilbert AS, Mason SL, Goodman AO, Barker RA. Health-related quality of life in Huntington's disease: Which factors matter most? *Mov Disord.* 2009 Mar 15;24(4):574-8.
130. Ferreira PL. Criação da versão portuguesa do MOS SF-36. Parte II - Testes de validação. *Acta Med Port.* 2003;13(3):119-27.
131. Ferreira IL, Nascimento MV, Ribeiro M, Almeida S, Cardoso SM, Grazina M, et al. Mitochondrial-dependent apoptosis in Huntington's disease human cybrids. *Exp Neurol.* 2010 Apr;222(2):243-55.
132. Wick AN, Drury DR, Nakada HI, Wolfe JB. Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose. *J Biol Chem.* 1957 Feb;224(2):963-9.
133. Ferreira IL, Cunha-Oliveira T, Nascimento MV, Ribeiro M, Proenca MT, Januario C, et al. Bioenergetic dysfunction in Huntington's disease human cybrids. *Exp Neurol.* 2011 Jun 13.
134. Stocchi V, Cucchiari L, Magnani M, Chiarantini L, Palma P, Crescentini G. Simultaneous extraction and reverse-phase high-performance liquid chromatographic determination of adenine and pyridine nucleotides in human red blood cells. *Anal Biochem.* 1985 Apr;146(1):118-24.
135. Bergmeyer HUB, J.; Grassl, M. . Methods of enzymatic analysis. *Metabolites 3: lipids, amino acids and related compounds:* VCH Pub; 1985.
136. Zhou Q, Lam PY, Han D, Caderas E. c-Jun N-terminal kinase regulates mitochondrial bioenergetics by modulating pyruvate dehydrogenase activity in primary cortical neurons. *J Neurochem.* 2008 Jan;104(2):325-35.
137. Choo YS, Mao Z, Johnson GV, Lesort M. Increased glutathione levels in cortical and striatal mitochondria of the R6/2 Huntington's disease mouse model. *Neurosci Lett.* 2005 Sep 23;386(1):63-8.
138. DeRosa G, Swick RW. Metabolic implications of the distribution of the alanine aminotransferase isoenzymes. *J Biol Chem.* 1975 Oct 25;250(20):7961-7.
139. Folstein SE, Chase GA, Wahl WE, McDonnell AM, Folstein MF. Huntington disease in Maryland: clinical aspects of racial variation. *Am J Hum Genet.* 1987 Aug;41(2):168-79.
140. Cummings JL. Behavioral and psychiatric symptoms associated with Huntington's disease. *Adv Neurol.* 1995;65:179-86.
141. Folstein SE. The psychopathology of Huntington's disease. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis.* 1991;69:181-91.
142. Shiwach R. Psychopathology in Huntington's disease patients. *Acta Psychiatr Scand.* 1994 Oct;90(4):241-6.
143. Ribai P, Nguyen K, Hahn-Bama V, Gourfinkel-An I, Vidailhet M, Legout A, et al. Psychiatric and cognitive difficulties as indicators of juvenile huntington disease onset in 29 patients. *Arch Neurol.* 2007 Jun;64(6):813-9.
144. Beglinger LJ, O'Rourke JJ, Wang C, Langbehn DR, Duff K, Paulsen JS. Earliest functional declines in Huntington disease. *Psychiatry Res.* 2010 Jul 30;178(2):414-8.
145. Orth M. Observing Huntington's disease: the European Huntington's Disease Network's

- REGISTRY. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010 Nov 19.
146. Andrew SE, Goldberg YP, Kremer B, Telenius H, Theilmann J, Adam S, et al. The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet*. 1993 Aug;4(4):398-403.
147. Duyao M, Ambrose C, Myers R, Novelletto A, Persichetti F, Frontali M, et al. Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat Genet*. 1993 Aug;4(4):387-92.
148. Brinkman RR, Mezei MM, Theilmann J, Almqvist E, Hayden MR. The likelihood of being affected with Huntington disease by a particular age, for a specific CAG size. *Am J Hum Genet*. 1997 May;60(5):1202-10.
149. Snell RG, MacMillan JC, Cheadle JP, Fenton I, Lazarou LP, Davies P, et al. Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nat Genet*. 1993 Aug;4(4):393-7.
150. Djousse L, Knowlton B, Hayden M, Almqvist EW, Brinkman R, Ross C, et al. Interaction of normal and expanded CAG repeat sizes influences age at onset of Huntington disease. *Am J Med Genet A*. 2003 Jun 15;119A(3):279-82.
151. Langbehn DR, Hayden MR, Paulsen JS. CAG-repeat length and the age of onset in Huntington disease (HD): a review and validation study of statistical approaches. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2010 Mar 5;153B(2):397-408.
152. Metzger S, Bauer P, Tomiuk J, Laccone F, Didonato S, Gellera C, et al. Genetic analysis of candidate genes modifying the age-at-onset in Huntington's disease. *Hum Genet*. 2006 Sep;120(2):285-92.
153. Chattopadhyay B, Baksi K, Mukhopadhyay S, Bhattacharyya NP. Modulation of age at onset of Huntington disease patients by variations in TP53 and human caspase activated DNase (hCAD) genes. *Neurosci Lett*. 2005 Feb 10;374(2):81-6.
154. Rosenblatt A, Brinkman RR, Liang KY, Almqvist EW, Margolis RL, Huang CY, et al. Familial influence on age of onset among siblings with Huntington disease. *Am J Med Genet*. 2001 Jul 8;105(5):399-403.
155. Li JL, Hayden MR, Almqvist EW, Brinkman RR, Durr A, Dode C, et al. A genome scan for modifiers of age at onset in Huntington disease: The HD MAPS study. *Am J Hum Genet*. 2003 Sep;73(3):682-7.
156. Gayan J, Brocklebank D, Andresen JM, Alkorta-Aranburu G, Zameel Cader M, Roberts SA, et al. Genomewide linkage scan reveals novel loci modifying age of onset of Huntington's disease in the Venezuelan HD kindreds. *Genet Epidemiol*. 2008 Jul;32(5):445-53.
157. Veitch NJ, Ennis M, McAbney JP, Shelbourne PF, Monckton DG. Inherited CAG/CTG allele length is a major modifier of somatic mutation length variability in Huntington disease. *DNA Repair (Amst)*. 2007 Jun 1;6(6):789-96.
158. Andresen JM, Gayan J, Cherny SS, Brocklebank D, Alkorta-Aranburu G, Addis EA, et al. Replication of twelve association studies for Huntington's disease residual age of onset in large Venezuelan kindreds. *J Med Genet*. 2007 Jan;44(1):44-50.
159. Rona-Voros K, Weydt P. The Role of PGC-1alpha in the Pathogenesis of Neurodegenerative Disorders. *Curr Drug Targets*. 2010 Jul 1.
160. Weydt P, Soyal SM, Gellera C, Didonato S, Weidinger C, Oberkofler H, et al. The gene coding for PGC-1alpha modifies age at onset in Huntington's Disease. *Mol Neurodegener*. 2009;4:3.
161. Smith GR, Shanley DP. Modelling the response of FOXO transcription factors to multiple post-translational modifications made by ageing-related signalling pathways. *PLoS One*. 2010;5(6):e11092.
162. Brocklebank D, Gayan J, Andresen JM, Roberts SA, Young AB, Snodgrass SR, et al. Repeat instability in the 27-39 CAG range of the HD gene in the Venezuelan kindreds: Counseling implications. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2009 Apr 5;150B(3):425-9.
163. Semaka A, Collins JA, Hayden MR. Unstable familial transmissions of Huntington disease alleles with 27-35 CAG repeats (intermediate alleles). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2010 Jan 5;153B(1):314-20.
164. Aziz NA, Jurgens CK, Landwehrmeyer GB, van Roon-Mom WM, van Ommen CJ, Stijnen T, et al. Normal and mutant HTT interact to affect clinical severity and progression in Huntington disease. *Neurology*. 2009 Oct 20;73(16):1280-5.
165. Lopez-Sendon JL, Royuela A, Trigo P, Orth M, Lange H, Reilmann R, et al. What is the impact of education on Huntington's disease? *Mov Disord*. 2011 Mar 22.
166. Koepsell ID, Kurland BF, Harel O, Johnson EA, Zhou XH, Kukull WA. Education, cognitive function, and severity of neuropathology in

- Alzheimer disease. *Neurology*. 2008 May 6;70(19 Pt 2):1732-9.
167. Riley KP, Snowden DA, Desrosiers MF, Markesbery WR. Early life linguistic ability, late life cognitive function, and neuropathology: findings from the Nun Study. *Neurobiol Aging*. 2005 Mar;26(3):341-7.
168. Ampuero I, Ros R, Royuela A, Abaira V, del Ser T, Garcia-Ribas G, et al. Risk factors for dementia of Alzheimer type and aging-associated cognitive decline in a Spanish population based sample, and in brains with pathology confirmed Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2008 Jun;14(2):179-91.
169. Jorm AF. Alzheimer's disease: risk and protection. *Med J Aust*. 1997 Oct 20;167(8):443-6.
170. Kremer B. Clinical neurology of Huntington's disease. In: Bates G, Harper, Peter S., Jones, Lesley, editor. *Huntington's disease* 3rd ed. Oxford; New York: Oxford University Press; 2002. p. 28-61.
171. Quarrell O. Juvenile Huntington's disease : (and other trinucleotide repeat disorders). Oxford ; New York: Oxford University Press; 2009.
172. Shoulson I. Clinical Features and Care. In: Fahn AETLaS, editor. *Movement Disorders* 4. Philadelphia: Saunders; 2010. p. 432-56.
173. Leigh RJ, Newman SA, Folstein SE, Lasker AG, Jensen BA. Abnormal ocular motor control in Huntington's disease. *Neurology*. 1983 Oct;33(10):1268-75.
174. Kirkwood SC, Siemers E, Bond C, Conneally PM, Christian JC, Foroud T. Confirmation of subtle motor changes among presymptomatic carriers of the Huntington disease gene. *Arch Neurol*. 2000 Jul;57(7):1040-4.
175. Blekher T, Johnson SA, Marshall J, White K, Hui S, Weaver M, et al. Saccades in presymptomatic and early stages of Huntington disease. *Neurology*. 2006 Aug 8;67(3):394-9.
176. Andre-Thomas M AX, de Ajuriaguerra J, Eullien L. . Troubles de l'elevation des globes oculaires dans un cas de choree de Huntington. *Rev Neurol* 1945(77):248-50.
177. Petit M MG. Anomalies of conjugated ocular movements in Huntington's chorea: application to early detection *Adv Neurol Clin*. 1973(1):287-94.
178. Avarzini G GF, Caraceni T, Spreafico R. Oculomotor disorders in Huntington's chorea. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1979;42(7):581-9.
179. Golding CV, Danchevjittr C, Hodgson TL, Tabrizi SJ, Kennard C. Identification of an oculomotor biomarker of preclinical Huntington disease. *Neurology*. 2006 Aug 8;67(3):485-7.
180. Rupp J, Blekher T, Jackson J, Beristain X, Marshall J, Hui S, et al. Progression in prediagnostic Huntington disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010 Apr;81(4):379-84.
181. Peltsch A, Hoffman A, Armstrong I, Pari G, Munoz DP. Saccadic impairments in Huntington's disease. *Exp Brain Res*. 2008 Apr;186(3):457-69.
182. Gaymard B, Rivaud S, Cassarini JF, Dubard T, Rancurel G, Agid Y, et al. Effects of anterior cingulate cortex lesions on ocular saccades in humans. *Exp Brain Res*. 1998 May;120(2):173-83.
183. Hicks SL, Robert MP, Golding CV, Tabrizi SJ, Kennard C. Oculomotor deficits indicate the progression of Huntington's disease. *Prog Brain Res*. 2008;171:555-8.
184. Koller WC, Trimble J. The gait abnormality of Huntington's disease. *Neurology*. 1985 Oct;35(10):1450-4.
185. Delval A, Krystkowiak P, Blatt JL, Labyt E, Bourriez JL, Dujardin K, et al. A biomechanical study of gait initiation in Huntington's disease. *Gait Posture*. 2007 Feb;25(2):279-88.
186. Tian J, Herdman SJ, Zee DS, Folstein SE. Postural stability in patients with Huntington's disease. *Neurology*. 1992 Jun;42(6):1232-8.
187. Grimbergen YA, Knol MJ, Bloem BR, Kremer BP, Roos RA, Munneke M. Falls and gait disturbances in Huntington's disease. *Mov Disord*. 2008 May 15;23(7):970-6.
188. Kloos AD, Kegelmeyer DA, Young GS, Kostyk SK. Fall risk assessment using the Tinetti mobility test in individuals with Huntington's disease. *Mov Disord*. 2010 Dec 15;25(16):2838-44.
189. Nehl C, Paulsen JS. Cognitive and psychiatric aspects of Huntington disease contribute to functional capacity. *J Nerv Ment Dis*. 2004 Jan;192(1):72-4.
190. Folstein S, Abbott MH, Chase GA, Jensen BA, Folstein MF. The association of affective disorder with Huntington's disease in a case series and in families. *Psychol Med*. 1983 Aug;13(3):537-42.
191. Marin RS. Apathy: Concept, Syndrome, Neural Mechanisms, and Treatment. *Semin Clin Neuropsychiatry*. 1996 Oct;1(4):304-14.
192. Levy R, Dubois B. Apathy and the functional anatomy of the prefrontal cortex-basal ganglia circuits. *Cereb Cortex*. 2006 Jul;16(7):916-28.
193. Brown RG, Pluck G. Negative symptoms: the 'pathology' of motivation and goal-directed

- behaviour. *Trends Neurosci.* 2000 Sep;23(9):412-7.
194. Kinney JA, Luria SM. Factor analysis of perceptual and cognitive abilities tested by different methods. *Percept Mot Skills.* 1980 Feb;50(1):59-69.
195. Eslinger PJ, Damasio AR. Severe disturbance of higher cognition after bilateral frontal lobe ablation: patient EVR. *Neurology.* 1985 Dec;35(12):1731-41.
196. Alexander GE, Crutcher MD. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.* 1990 Jul;13(7):266-71.
197. Litvan I. Therapy and management of frontal lobe dementia patients. *Neurology.* 2001 Jun;56(11 Suppl 4):S41-5.
198. Andreasen NC, Calarge CA, O'Leary DS. Theory of mind and schizophrenia: a positron emission tomography study of medication-free patients. *Schizophr Bull.* 2008 Jul;34(4):708-19.
199. Craig AH, Cummings JL, Fairbanks L, Itti L, Miller BL, Li J, et al. Cerebral blood flow correlates of apathy in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 1996 Nov;53(11):1116-20.
200. Paulsen JS, Ready RE, Hamilton JM, Mega MS, Cummings JL. Neuropsychiatric aspects of Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2001 Sep;71(3):310-4.
201. Naarding P, Janzing JG, Eling P, van der Werf S, Kremer B. Apathy is not depression in Huntington's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2009 Summer;21(3):266-70.
202. Duff K, Paulsen JS, Beglinger LJ, Langbehn DR, Wang C, Stout JC, et al. "Frontal" behaviors before the diagnosis of Huntington's disease and their relationship to markers of disease progression: evidence of early lack of awareness. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2010 Spring;22(2):196-207.
203. Kenney C, Hunter C, Jankovic J. Long-term tolerability of tetrabenazine in the treatment of hyperkinetic movement disorders. *Mov Disord.* 2007 Jan 15;22(2):193-7.
204. Tetrabenazine as antichorea therapy in Huntington disease: a randomized controlled trial. *Neurology.* 2006 Feb 14;66(3):366-72.
205. Frank S. Tetrabenazine as anti-chorea therapy in Huntington disease: an open-label continuation study. Huntington Study Group/TETRA-HD Investigators. *BMC Neurol.* 2009;9:62.
206. Trial watch: NeuroSearch's dopaminergic stabilizer improves movement disorders in Huntington's disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Apr;9(4):260.
207. Parsons CG, Danysz W, Quack G. Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist—a review of preclinical data. *Neuropharmacology.* 1999 Jun;38(6):735-67.
208. McShane R, Areosa Sastre A, Minakaran N. Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006(2):CD003154.
209. Barr AN, Fischer JH, Koller WC, Spunt AL, Singhal A. Serum haloperidol concentration and choreiform movements in Huntington's disease. *Neurology.* 1988 Jan;38(1):84-8.
210. Bonelli RM, Mahnert FA, Niederwieser G. Olanzapine for Huntington's disease: an open label study. *Clin Neuropharmacol.* 2002 Sep-Oct;25(5):263-5.
211. van Vugt JP, Siesling S, Vergeer M, van der Velde EA, Roos RA. Clozapine versus placebo in Huntington's disease: a double blind randomised comparative study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1997 Jul;63(1):35-9.
212. Brusa L, Orlacchio A, Moschella V, Iani C, Bernardi G, Mercuri NB. Treatment of the symptoms of Huntington's disease: preliminary results comparing aripiprazole and tetrabenazine. *Mov Disord.* 2009 Jan 15;24(1):126-9.
213. Bonomi AE, Patrick DL, Bushnell DM, Martin M. Validation of the United States' version of the World Health Organization Quality of Life (WHOQOL) instrument. *J Clin Epidemiol.* 2000 Jan;53(1):1-12.
214. Helder DI, Kaptein AA, van Kempen GM, van Houwelingen JC, Roos RA. Impact of Huntington's disease on quality of life. *Mov Disord.* 2001 Mar;16(2):325-30.
215. Busse ME, Khalil H, Quinn L, Rosser AE. Physical therapy intervention for people with Huntington disease. *Phys Ther.* 2008 Jul;88(7):820-31.
216. Ready RE, Mathews M, Leserman A, Paulsen JS. Patient and caregiver quality of life in Huntington's disease. *Mov Disord.* 2008 Apr 15;23(5):721-6.
217. Bisschop MI, Kriegsman DM, Beekman AT, Deeg DJ. Chronic diseases and depression: the modifying role of psychosocial resources. *Soc Sci Med.* 2004 Aug;59(4):721-33.
218. Kaptein AA, Scharloo M, Helder DI, Snoei L, van Kempen GM, Weinman J, et al. Quality of life in couples living with Huntington's disease: the role of patients' and partners' illness

- perceptions. *Qual Life Res.* 2007 Jun;16(5):793-801.
219. Aziz NA, van der Burg JM, Landwehrmeyer GB, Brundin P, Stijnen T, Roos RA. Weight loss in Huntington disease increases with higher CAG repeat number. *Neurology.* 2008 Nov 4;71(19):1506-13.
220. Berent S, Giordani B, Lehtinen S, Markel D, Penney JB, Buchtel HA, et al. Positron emission tomographic scan investigations of Huntington's disease: cerebral metabolic correlates of cognitive function. *Ann Neurol.* 1988 Jun;23(6):541-6.
221. Kuhl DE, Metter EJ, Riege WH. Patterns of local cerebral glucose utilization determined in Parkinson's disease by the [<sup>18</sup>F]fluorodeoxyglucose method. *Ann Neurol.* 1984 May;15(5):419-24.
222. Leenders KL, Frackowiak RS, Quinn N, Marsden CD. Brain energy metabolism and dopaminergic function in Huntington's disease measured in vivo using positron emission tomography. *Mov Disord.* 1986;1(1):69-77.
223. Stahl WL, Swanson PD. Biochemical abnormalities in Huntington's chorea brains. *Neurology.* 1974 Sep;24(9):813-9.
224. Browne SE, Bowling AC, MacGarvey U, Baik MJ, Berger SC, Muqit MM, et al. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol.* 1997 May;41(5):646-53.
225. Gu M, Gash MI, Mann VM, Javoy-Agid F, Cooper JM, Schapira AH. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann Neurol.* 1996 Mar;39(3):385-9.
226. Brouillet E, Jacquard C, Bizat N, Blum D. 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem.* 2005 Dec;95(6):1521-40.
227. Ludolph AC, Seelig M, Ludolph AG, Sabri MI, Spencer PS. ATP deficits and neuronal degeneration induced by 3-nitropropionic acid. *Ann N Y Acad Sci.* 1992 May 11;648:300-2.
228. Borlongan CV, Koutouzis TK, Sanberg PR. 3-Nitropropionic acid animal model and Huntington's disease. *Neurosci Biobehav Rev.* 1997 May;21(3):289-93.
229. Brustovetsky N, Brustovetsky T, Purl KJ, Capano M, Crompton M, Dubinsky JM. Increased susceptibility of striatal mitochondria to calcium-induced permeability transition. *J Neurosci.* 2003 Jun 15;23(12):4858-67.
230. Tabrizi SJ, Workman J, Hart PE, Mangiarini L, Mahal A, Bates G, et al. Mitochondrial dysfunction and free radical damage in the Huntington R6/2 transgenic mouse. *Ann Neurol.* 2000 Jan;47(1):80-6.
231. Sawa A, Wiegand GW, Cooper J, Margolis RL, Sharp AH, Lawler JF, Jr., et al. Increased apoptosis of Huntington disease lymphoblasts associated with repeat length-dependent mitochondrial depolarization. *Nat Med.* 1999 Oct;5(10):1194-8.
232. Lodi R, Schapira AH, Manners D, Styles P, Wood NW, Taylor DJ, et al. Abnormal in vivo skeletal muscle energy metabolism in Huntington's disease and dentatorubropallidolusian atrophy. *Ann Neurol.* 2000 Jul;48(1):72-6.
233. Panov AV, Gutekunst CA, Leavitt BR, Hayden MR, Burke JR, Strittmatter WJ, et al. Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci.* 2002 Aug;5(8):731-6.
234. Parker WD, Jr., Boyson SJ, Luder AS, Parks JK. Evidence for a defect in NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) in Huntington's disease. *Neurology.* 1990 Aug;40(8):1231-4.
235. Bossy-Wetzell E, Petrilli A, Knott AB. Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci.* 2008 Dec;31(12):609-16.
236. Rosenstock TR, Duarte AI, Rego AC. Mitochondrial-Associated Metabolic Changes and Neurodegeneration in Huntington's Disease - From Clinical Features to the Bench. *Curr Drug Targets.* 2010 Jul 1.
237. King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science.* 1989 Oct 27;246(4929):500-3.
238. Koroshetz WJ, Jenkins BG, Rosen BR, Beal MF. Energy metabolism defects in Huntington's disease and effects of coenzyme Q10. *Ann Neurol.* 1997 Feb;41(2):160-5.
239. Powers WJ, Videen TO, Markham J, McGee-Minnich L, Antenor-Dorsey JV, Hershey T, et al. Selective defect of in vivo glycolysis in early Huntington's disease striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Feb 20;104(8):2945-9.
240. Saft C, Zange J, Andrich J, Muller K, Lindenberg K, Landwehrmeyer B, et al. Mitochondrial impairment in patients and asymptomatic mutation carriers of Huntington's disease. *Mov Disord.* 2005 Jun;20(6):674-9.

241. Rego AC, Ward MW, Nicholls DG. Mitochondria control ampa/kainate receptor-induced cytoplasmic calcium deregulation in rat cerebellar granule cells. *J Neurosci*. 2001 Mar 15;21(6):1893-901.
242. St John JC, Amaral A, Bowles E, Oliveira JF, Lloyd R, Freitas M, et al. The analysis of mitochondria and mitochondrial DNA in human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol*. 2006;331:347-74.
243. Sorbi S, Bird ED, Blass JP. Decreased pyruvate dehydrogenase complex activity in Huntington and Alzheimer brain. *Ann Neurol*. 1983 Jan;13(1):72-8.
244. Butterworth J, Yates CM, Reynolds GP. Distribution of phosphate-activated glutaminase, succinic dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase and gamma-glutamyl transpeptidase in post-mortem brain from Huntington's disease and agonal cases. *J Neurol Sci*. 1985 Feb;67(2):161-71.
245. Perluigi M, Poon HF, Maragos W, Pierce WM, Klein JB, Calabrese V, et al. Proteomic analysis of protein expression and oxidative modification in r6/2 transgenic mice a model of Huntington disease. *Mol Cell Proteomics*. 2005 Dec;4(12):1849-61.