

LEONARDO LOPES SILVEIRA

**PERFIL OXIDATIVO E SUA ASSOCIAÇÃO COM DIFERENTES ESTÁGIOS DA
DOENÇA DE HUNTINGTON EM PACIENTES DE ERVÁLIA/MG**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Sílvia Almeida Cardoso

Coorientadores: Lucas Vilas Boas Magalhães
Leandro Licursi de Oliveira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central
da Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S587p
2020
Silveira, Leonardo Lopes, 1977-
Perfil oxidativo e sua associação com diferentes estágios da doença de
Huntington em pacientes de Ervália/MG / Leonardo Lopes Silveira. -
Viçosa, MG, 2020.
61 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Sílvia Almeida Cardoso.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Doença de Huntington. 2. Estresse oxidativo. 3. Disfunção
cognitiva. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Medicina e Enfermagem. Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde. II. Título.

CDD 22
ed. 616.851

LEONARDO LOPES SILVEIRA

**PERFIL OXIDATIVO E SUA ASSOCIAÇÃO COM DIFERENTES ESTÁGIOS DA
DOENÇA DE HUNTINGTON EM PACIENTES DE ERVÁLIA/MG**

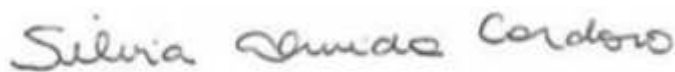
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 03 de julho de 2020.

Assentimento:



Leonardo Lopes Silveira
Autor



Sílvia Almeida Cardoso
Orientadora

*A minha filha Ana Júlia, fonte de amor e
inspiração, presente de DEUS em minha vida. Ao
meu amor, Pâmella e a toda a nossa família.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS em primeiro lugar, pela força e por me ajudar a realizar esse sonho. Sem ELE e suas bênçãos diárias nada seria possível.

Aos meus Pais, Consuelo e Edite, pelas orações e pelo exemplo de luta.

Aos meus queridos irmãos Ricardo e Consuelo, fonte de apoio e inspiração.

Minhas cunhadas Paola, Denise, Tatiana e a Bete pelo carinho e amizade.

Meus sobrinhos Thales, Larissa, Maria Eduarda, Carolina e Sarah, vocês fazem tudo ficar mais leve e me enchem de orgulho.

A minha querida esposa Pâmella, pela paciência, companheirismo e amor e por entender o quanto esse sonho era importante para nós.

Minha querida filha Ana Júlia, por sua alegria, amor e carinho. Seu sorriso é meu alimento diário.

A professora Silvia, pela sabedoria, respeito, conselhos, humildade e orientação. Sem o seu vasto conhecimento eu não conseguiria concluir esse estudo.

Aos professores Rodrigo e Fabrício, por fazerem parte desse projeto desde o início com toda disponibilidade, atenção e conhecimentos.

Ao professor Leandro, por todas as aulas e orientações e pela ajuda no laboratório.

Aos professores da banca, por aceitarem o meu convite com carinho.

Aos pacientes e familiares, por entenderem o quanto esse estudo era importante e assim permitir que eu entrasse nos seus lares e levasse esse trabalho em frente.

Aos colegas de mestrado, pelo companheirismo e amizade.

A todos da UFV, essa renomada Universidade que fazia parte dos meus sonhos e onde fui recebido com muito carinho e atenção. Sinto-me orgulhoso por ter estudado nessa instituição.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

SILVEIRA, Leonardo Lopes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2020. **Perfil oxidativo e sua associação com diferentes estágios da doença de Huntington em pacientes de Ervália/MG.** Orientadora: Silvia Almeida Cardoso. Coorientadores: Lucas Vilas Boas Magalhães e Leandro Licursi de Oliveira.

Introdução: A doença de Huntington (DH) é uma doença neurológica hereditária, progressiva e incapacitante, que desperta a atenção pelos sintomas característicos e impactantes como os movimentos coreicos. O estresse oxidativo apresenta-se como um agente integrante na fisiopatologia da DH podendo resultar em danos a membranas celulares assim comprometendo sua integridade e viabilidade. **Objetivo:** Avaliar o perfil oxidativo de portadores da DH em diferentes estágios de capacidade funcional e determinar sua relação com marcadores hematológicos. **Material e métodos:** Pesquisa contou com a participação de 09 voluntários portadores da DH residentes na cidade de Ervália/Minas Gerais. Os voluntários foram estratificados segundo a capacidade funcional total, utilizando a escala UHDRS- Unified Huntingtons Diseases Rating Scale. Foram estabelecidos dois grupos, o primeiro com pacientes em estágio mais avançado e capacidade funcional diminuída e o Segundo com pacientes em estágio menos avançado e capacidade funcional ainda ativa. Foram realizadas análises hematológicas, para definição do hemograma e leucograma. A partir do soro foram realizadas avaliações espectrofotométricas para avaliação da capacidade antioxidante total (FRAP), determinação da atividade das enzimas Catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e Glutathione-S-transferase (GST) e quantificação dos marcadores de dano proteínas carboniladas e produto de lipoperoxidação (MDA). **Resultados:** Observou-se alterações hematológicas significativas que evidenciaram que o grupo funcionalmente mais acometido apresentava níveis significativamente inferiores de hemoglobina e hematócrito. Embora não tenha sido observado alteração na quantificação da capacidade antioxidante total sérica e da atividade das enzimas antioxidantes SOD e GST, entre os dois grupos avaliados, a atividade da enzima CAT apresentou-se significativamente reduzida no grupo DH em estágio mais incapacitante. **Conclusão:** Os achados demonstram relação do estresse oxidativo com a evolução clínica da DH, com ênfase na depleção da enzima antioxidante catalase e sua relação com marcadores hematológicos. Apontando essa relação como um importante fator no estabelecimento de condutas preventivas para melhora da qualidade de vida dos pacientes.

Palavras-chave: Doença de Huntington. Estresse oxidativo. Disfunção Cognitiva

ABSTRACT

SILVEIRA, Leonardo Lopes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2020. **Oxidative profile and its association with different stages of Huntington's disease in patients from Ervália/MG.** Advisor: Silvia Almeida Cardoso. Co-advisors: Lucas Vilas Boas Magalhães and Leandro Licursi de Oliveira.

Introduction: The Huntington's disease (HD) is a hereditary neurological, progressive and disabling disease, drawing attention due to its specific and impactful symptoms, such as the chorea movements. The oxidative stress presents itself as an integral agent in the pathophysiology of HD and may result in damage to cell membranes, thus compromising their integrity and viability. **Objective:** To evaluate the oxidative profile of HD patients at different stages of functional mobility and determine its relationship with hematological markers. **Material and Methods:** The survey counted with the participation of nine volunteers with HD residing in the city of Ervália/Minas Gerais. The volunteers were stratified according to the total functional mobility, using the scale UHDRS- Unified Huntington's Disease Rating Scale. Two groups were established: the first with patients at a more advanced stage and reduced functional mobility and the second with patients in less advanced stage and functional mobility still active. Hematological analyses were performed to define the red and white blood cell counts. From the serum, spectrophotometric assessments were performed to evaluate the total antioxidant capacity (TAC), determination of the activity of the enzymes Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and Glutathione-S-transferase (GST) and quantification of damage markers protein carbonyl and product of lipid peroxidation (MDA). **Results:** There were significant hematologic changes that showed that the most functionally affected group showed significantly lower levels of hemoglobin and hematocrit. Although there was no alteration in the quantification of serum total antioxidant capacity and the activity of the antioxidants enzymes SOD and GST, between the two groups assessed, the CAT enzyme activity was significantly reduced in the HD group at more advanced incapacitating stage. **Conclusion:** These findings demonstrate the relationship between oxidative stress and the HD clinical evolution, with emphasis on the depletion of antioxidant enzyme catalase and its relation with hematological markers. Pointing out this relationship as an important factor in the establishment of preventive behaviors to improve the quality of life of patients.

Keywords: Huntington's disease. Oxidative stress. Cognitive Dysfunction

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Capacidade antioxidante total sérica. Avaliação da capacidade de redução férrica (FRAP)	30
Figura 2 – Detecção da atividade enzimática sérica. Avaliação de Catalase (A), Superóxido dismutase (B) e Glutathione S transferase (C).....	31
Figura 3 – Quantificação de marcadores de dano tecidual. Avaliação de peroxidação lipídica determinada por MDA (A) e proteínas carboniladas (B).....	31
Figura 4 – Dispersão e correlação de Pearson (r). Variáveis CAT/MDA	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Perfil hematológico dos voluntários com DH da cidade de Ervália/ Minas Gerais.....	29
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP = Trifosfato de Adenosina

BHE = Barreira Hematoencefálica

BSA = Albumina de Soro Bovino

C = Citocromo

CAT = Catalase

CDNB = 1-Cloro-2,4-Dinitrobenzeno

CEP-UFV = Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa

COX = Ciclooxygenase

DEM = Departamento de Enfermagem e Medicina

DH= Doença de Huntington

DMSO = Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo

DNA = Ácido Desoxirribonucleico

EDTA = Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ERNs = Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs = Espécies Reativas de Oxigênio

GSH = Glutationa

GST = Glutationa-s-transferase

H₃O₄ = Ácido Fosfórico

HCL = Ácido Clorídrico

IBGE = Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IL = Interleucina

MDA = Malondialdeído

MHC = Complexo de Histocompatibilidade Principal

NADPH = Hidrogênio Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida

NADPH = Taxa de Oxidação

NFT = Emaranhados Neurofibrilares

O₂⁻ = Superóxido

PCR = Proteína C Reativa

SNC = Sistema Nervoso Central

SNP = Sistema Nervoso Periférico

SOD = Superóxido Dismutase

TA = Termo de Assentimento

TALE = Termo de Assentimento Livre Esclarecido

TBARS = Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TCLE = Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TFC= Teste de capacidade funcional

TNF = Fator de Necrose Tumoral

UFV = Universidade Federal de Viçosa

UHDRS= Escala unificada para avaliação da doença de Huntington

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO.....	12
2 INTRODUÇÃO.....	13
3 OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo Geral.....	17
3.2.1Objetivos Específicos.....	17
4 METODOLOGIA	18
5 PRODUTO FINAL	22
5.1 Artigo	22
5.2 Produto Técnico - Folder explicativo	40
6 CONCLUSÃO	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
8. ANEXOS.....	46
8.1 ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo.....	46
8.2 ANEXO B – Teste de capacidade funcional da DH	49
8.3 ANEXO C – Aprovação do projeto pelo CEP – UFV.....	51
8.4 ANEXO D – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido.....	56
8.5 ANEXO E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	59

1 APRESENTAÇÃO

A presente dissertação foi elaborada de acordo com as normas estabelecidas pela PróReitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Viçosa – UFV. O corpo do trabalho compreende a introdução geral, os objetivos, geral e específicos, a metodologia, um artigo científico original, um folder explicativo e a conclusão geral. O artigo original intitulado: “**Avaliação do perfil oxidativo em pacientes com doença de Huntington em diferentes estágios, na cidade de Ervália/MG**”, foi submetido à revista Brain Research Bulletin (QUALIS B1 – Anexo A).

2 INTRODUÇÃO

2.1 A Doença de Huntington

As doenças neurodegenerativas são as principais causas de morbidade e deficiência, por isso estão ganhando mais atenção, uma vez que impõe um impacto socioeconômico considerável na população em geral. (CHITNIS; WEINER, 2017).

A doença de Huntington (DH) é uma doença neurodegenerativa autossômica dominante causada por uma extensão de repetição da sequência CAG no gene *HTT*, que codifica a proteína huntingtina (Htt), resultando na aparência de um longo trato de poliglutamina no produto genético. O acúmulo da proteína no citoplasma e no núcleo dos neurônios é, provavelmente o responsável pela degradação dos neurônios. Em muitos distúrbios neurodegenerativos, o comprometimento mitocondrial e o estresse oxidativo desempenham um papel importante na progressão da doença (JEĐRAK et al., 2018). Sendo relatada pela primeira vez por George Huntington em 1872 como uma coreia hereditária. O relato foi sobre os sintomas cognitivos e psiquiátricos, e sua natureza hereditária. Se tratando de uma doença progressiva (MCCOLGAN; TABRIZI, 2018).

Os sintomas da DH variam entre os portadores da doença, mas na maioria das vezes incluem sintomas motores, cognitivos e psiquiátricos. Os sintomas motores demonstram a principal característica da doença, que são os movimentos coreicos, levando a distúrbios da marcha que tendem a aparecer mais no início da doença e outros comprometimentos motores, que normalmente aparecem em um estágio mais avançado como bradicinesia e rigidez. Os sintomas cognitivos já aparecem antes mesmo do diagnóstico e tendem a progredir à medida que a doença avança. Os déficits incluem lentidão cognitiva e diminuição da atenção. Já os Sintomas psiquiátricos e emocionais também são observados precocemente em pacientes em DH. Os pacientes portadores da doença são normalmente depressivos e mostram sinais irritabilidade e impulsividade (SAUDOU; HUMBERT, 2016).

Dentre os vários distúrbios provocados pela DH, o que mais se destaca e chama a atenção são os movimentos coreicos e se caracteriza por provocar movimentos hipercinéticos e movimentos involuntários rápidos, semelhantes à dança que fluem de uma área do corpo para outra (FEINSTEIN; WALKER, 2018).

A idade média de início da DH é de 40 anos. E uma expectativa de sobrevida média de 14,5 a 20 anos após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos, sendo que a DH juvenil tem

uma sobrevivida de aproximadamente 10 anos, segundo KIM e colaboradores em 2016. Esse estudo também relatou que não ocorre diferenças de gênero quanto ao aparecimento da doença e que um entendimento sobre a perspectiva de vida dos portadores da DH, são importantes no contato terapêutico com o paciente e podem identificar dados relacionados a progressão dos sintomas da doença.

Os critérios utilizados para um diagnóstico da DH são: o histórico familiar, devido a sua hereditariedade, além dos sinais inequívocos da doença como o déficit motor (principalmente os movimentos coreicos), distúrbios psiquiátricos e alterações cognitivas, sem outra causa aparente. Os pacientes que apresentam estes sintomas devem ser submetidos ao teste genético, de forma a confirmar o diagnóstico de DH (CHEONG; GABERY; PETERSÉN, 2019).

Através do teste genético a DH pode ser diagnosticada com base no trato CAG expandido. Com o trato CAG mais longo a doença pode aparecer de forma precoce, até mesmo na forma juvenil. No entanto, embora a característica principal da doença seja o distúrbio do movimento produzido pela disfunção e degeneração neuronal, a DH, como dito anteriormente, tem muitas outras manifestações menos específicas, incluindo distúrbios psiquiátricos. De fato, o exame mais detalhado dos portadores da DH revela outras alterações como as cognitivas, motoras e sensoriais, além de marcadores inflamatórios, detectáveis muitos anos antes do diagnóstico clínico (GUSELLA; MACDONALD, 2009).

Em 1992 o gene HTT foi mapeado e clonado com impacto extremamente significativo no campo da genética, pois foi a primeira vez que a identificação de uma mutação relevante para a doença em um gene até então desconhecido foi bem-sucedido (NGUYEN; WEYDT, 2018).

Atualmente não há tratamento para retardar o início ou a progressão da DH. Um estudo recente pode mudar toda visão sobre o futuro dos portadores da doença, com a estratégia de silenciamento genético específica do alelo *HTT*, bloqueando o avanço da doença. (CHAO et al., 2017).

2. 2 A prevalência da Doença de Huntington

A DH é observada em todo o mundo com maior incidência em algumas regiões geográficas. Há evidências consistentes de uma menor incidência nas populações asiáticas. Também há evidências de que na Austrália, América do Norte e Europa Ocidental

(incluindo o Reino Unido), a prevalência venha aumentando nos últimos 50 anos ou mais (RAWLINS et al., 2016).

Nos EUA e Austrália estima-se 5,7 casos em cada 100.000 (cem mil) habitantes (PRINGSHEIM et al., 2012 e BATES et al., 2015).

A cidade de Ervália fica situada na Zona da Mata de Minas Gerais e possui, segundo o CENSO 2010, uma população de 17.946 habitantes e uma população estimada para o ano de 2019 de 18.895 habitantes. Possui na economia, a agricultura como fonte de renda principal e apenas 14,8% de sua população economicamente ativa. Na educação, sua taxa de escolarização entre 6 e 14 anos é de 93,6% e na área da saúde, a taxa de mortalidade infantil é de 4,5 para 1.000 nascidos vivos, o que comparativamente com o restante das cidades do Estado de Minas Gerais, coloca-se em 572 de 853 municípios. A cidade possui alguns casos de DH e famílias com histórico de portadores da doença.

Ao analisar algumas famílias, com histórico familiar de DH, da cidade de Ervália/MG, a taxa mínima de prevalência encontrada foi de 7,2 / 10.000 pessoas, superior à prevalência mundial.

A prevalência mínima de DH em Ervália foi pelo menos 10,3 a 14,4 vezes maior que a da população mundial, embora não represente a prevalência geral da doença no Brasil. Certamente, uma pesquisa ampliada no país levará a uma estimativa de prevalência mais baixa que a da Ervália/MG (AGOSTINHO et al., 2015).

2.3 A Doença de Huntington e o estresse oxidativo

A geração de radicais livres faz parte de um processo contínuo e fisiológico do nosso organismo. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações químicas. A produção de radicais livres durante os processos metabólicos, instalam uma situação de estresse oxidativo, decorrido de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes. Por isso, o nosso organismo desenvolve mecanismos de defesa antioxidante, seja através das enzimas antioxidantes ou de forma exógena, com a introdução de vitaminas na dieta. O objetivo é exatamente controlar os danos provocados pelo aumento de radicais livres e do estresse oxidativo (BARBOSA et al., 2010).

Como parte do processo natural da respiração celular, as mitocôndrias produzem diversas espécies reativas de oxigênio (EROS) que podem estar aumentadas em condições

patológicas, com ênfase no radical superóxido. Outras espécies reativas como o peróxido de hidrogênio, podem difundir livremente e na presença de metais facilitar a geração de radicais de hidroxila (NUNOMURA et al., 2001).

As doenças neurodegenerativas, como o mal de Alzheimer, Parkinson e a doença de Huntington tem em sua patogênese, a participação de mitocôndrias alteradas. Essas mitocôndrias são a principal fonte intracelular de EROS. Em todas essas condições degenerativas, o dano oxidativo está presente, juntamente com a disfunção mitocondrial, implicados no envelhecimento (XUN et al., 2012).

Com o aumento da idade o estresse oxidativo também aumenta e ocorre a diminuição da capacidade de responder ao dano oxidativo das proteínas, contribuindo para o acúmulo de proteínas oxidativamente danificadas. Em pessoas afetadas por doenças neurodegenerativas como a DH, EROS são gerados durante o metabolismo celular e estão presentes no cérebro e a degeneração neuronal é observada devido o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial (JOHRI; BEAL, 2012).

A participação do estresse oxidativo na fisiopatologia da DH vem sendo descrita, com a atuação de EROS na ativação da NADPH oxidase envolvida na ativação da micróglia (TUNEZ et al., 2011; MULLER e LEAWITT., 2014; QUIN et al., 2013). A abundante presença de NO nesse ambiente contribui para a formação de radicais peroxinitritos altamente neurotóxicos (CALABRESE et al., 2009). A alta suscetibilidade de células neuronais às lesões mediadas por espécies reativas, assim como sua alta exigência do metabolismo oxidativo e a grande presença de ácidos graxos poli-insaturados em membranas neuronais, contribuem para os impactos do estresse oxidativo no sistema nervoso central (HALLIWELL, 1992).

De acordo com Palmieri e Sblendorio em 2007, a área da saúde em geral, está cada vez mais convencida da importância do rastreamento e monitorização dos radicais livres e dos estudos sobre o estresse oxidativo.

Diante do exposto acima, o estudo visa ampliar o conhecimento do perfil oxidativo de pacientes com doença de Huntington e sua relação com a progressão da doença. Com o intuito de auxiliar no tratamento e condução clínica de pacientes com a referida condição.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Relacionar o grau de progressão funcional de portadores da doença de Huntington da cidade de Ervália com o perfil oxidativo.

3.2 Objetivos Específicos

- Acessar pacientes portadores da doença de Huntington;
- Avaliar a capacidade funcional total (TFC) dos pacientes;
- Obter e processar o material biológico;
- Realizar análise dos componentes celulares hematológicos;
- Quantificar a capacidade antioxidante sérica total, a atividade de enzimas antioxidantes e os marcadores de dano relacionados ao processo oxidativo.
- Correlacionar estatisticamente as variáveis analisadas.

4 METODOLOGIA

4.1 *Desenho do estudo*

Neste estudo participaram nove voluntários portadores de DH da cidade de Ervália, Minas Gerais/Brasil. Foram incluídos portadores de DH de ambos os sexos, com idade entre: 30 e 80 anos.

Os voluntários foram avaliados por um fisioterapeuta para a determinação da capacidade funcional total, utilizando a escala UHDRS - Unified Huntingtons Disease Rating Scale (Escala unificada para avaliação da doença de Huntington) (ANEXO B). Os pacientes foram divididos em dois grupos conforme a progressão da doença: pacientes com estágio mais avançado e capacidade funcional diminuída, (denominados DH1) e pacientes em estágio menos avançado e com capacidade funcional ainda ativa, (denominados DH2).

A coleta das amostras foi realizada no período de abril a setembro de 2019, após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa (CEP-UFV), parecer número 3.265.178 (ANEXO C).

4.2 *Coleta de amostra biológica*

Após a aceitação da participação na pesquisa pela assinatura do Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (ANEXO D) e do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO E). A amostra sanguínea foi coletada por punção venosa, sendo realizada por profissional devidamente habilitado. Foram coletados dois tubos, um com anticoagulante para análise do hemograma e leucograma por impedância e um segundo tubo sem anticoagulante para obtenção do soro. Após retração do coágulo a amostra foi centrifugada e o soro armazenado à -4°C, para as análises posteriores.

4.3 *Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo*

4.3.1 *Capacidade sérica antioxidante total*

A quantificação da capacidade sérica antioxidante total foi baseada no método da capacidade de redução férrica (FRAP) (BENZIE et al., 1996). Para tanto dez µL de amostra/padrão foram adicionados a 220 µL de solução FRAP em microplacas de poliestireno, que foram incubadas no escuro por 30 minutos. Como agente oxidante foi utilizada uma

solução de Trolox, partindo de uma concentração de 2 mmol.L^{-1} . As leituras foram realizadas no espectrofotômetro Multiskan GO Microplate Spectrophotometer spectrophotometer (Thermo Scientific) em comprimento de onda 570 nm. As concentrações relativas foram obtidas a partir da curva padrão sendo os resultados expressos em μM .

4.3.2 Atividade das enzimas antioxidantes

A determinação da atividade catalítica da SOD foi realizada pelo método do pirogalol baseado na capacidade da enzima de catalisar a reação do superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio, de acordo com Sarban e colaboradores (2005). Para isso, 30 μl de amostra foram adicionadas a 99 μl de tampão fosfato (0,1M pH 7,0), 6 μl de MTT (1,25 mm) e 15 μl de pirogalol (100 μM) em placa de 96 poços e incubados durante 5 minutos a 37°C . O padrão e o branco foram feitos da mesma maneira, porém para ambos sem amostra e utilizando 129 μl e 144 μl de tampão, respectivamente. No branco não foi adicionado pirogalol. Após a incubação, foi estabelecida a reação com 150 μl de DMSO (1,25 mm) e as amostras foram submetidas à leitura a 570 nm em leitor de placas (Thermo Scientific MultiskanTM GO). A atividade enzimática foi expressa em Unidades de SOD por mg de proteína.

A atividade enzimática da Catalase foi avaliada medindo a cinética de decomposição de H_2O_2 , de acordo com AEBI (1984). Para isso, 6 μL de amostra juntamente com 600 μL de tampão Fosfato (0,1 M e pH 7,0) foram utilizados como branco para cada amostra enquanto que, para leitura, o tampão Fosfato foi acrescido de H_2O_2 (30%). Dessa forma, em uma cubeta de Quartzo, as amostras foram submetidas à leitura a 240 nm em espectrofotômetro, durante 60 segundos, para acompanhamento da cinética enzimática. A atividade enzimática foi expressa em Unidades de Catalase por mg de proteína.

Na determinação da atividade enzimática da Glutationa S-transferase, no soro dos voluntários, foi realizada a quantificação do produto formado a partir da complexação de glutatona reduzida (GSH) com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) de acordo com o método descrito por HABIG e colaboradores (1974) e foi calculada pela taxa de oxidação de NADPH. Dessa forma, em uma cubeta de Quartzo, foram pipetados 682 μl de tampão Fosfato (0,1 M e pH 7,0) juntamente com 6 μl de CDNB (0,1 M), 6 μl de amostra e 6 μl de solução de GSH (0,1 M) e a taxa de reação da enzima presente nas amostras foi monitorada a 340 nm em espectrofotômetro, durante 90 segundos, para acompanhamento da cinética enzimática. Foi realizado também um branco para o experimento, o qual não possui adição da amostra e foi utilizado para verificar a taxa de reações não-enzimáticas. A atividade enzimática foi expressa

em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$, onde uma unidade de atividade representa a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μmol de produto por minuto e por grama de amostra, nas condições do ensaio.

4.3.4 Marcadores de dano

Para quantificar os produtos provenientes da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeídos e demais aldeídos de baixo peso molecular), as amostras de soro foram submetidas à reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com a metodologia de BUEGE e AUST (1978). Dessa forma, 200 μl de cada amostra foram adicionados a 400 μl de solução de TBARS (15% de TCA, 0,375% de TBA e 0,25M de HCL), agitados no vórtex durante 10 segundos e colocados em banho-maria, a 90°C, durante 40 minutos. Em seguida, após resfriamento, foi efetuada a extração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico com a adição de 600 μl de n-butanol, seguida da centrifugação a 3500 rpm, durante 5 minutos. Por fim, após centrifugação, 200 μl dos sobrenadantes foram cuidadosamente retirados e submetidos à leitura a 535 nm. Os valores de TBARS foram expressos em ηmols de malondialdeído (MDA) por mg de proteína.

A dosagem de proteínas carboniladas no soro foram determinadas de acordo com a metodologia de Levine e colaboradores (1990). Dessa forma, o precipitado obtido pela centrifugação do foi ressuscitado com 1 ml de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) e este dividido em dois eppendorfs (amostras e brancos), com 500 μL em cada. Em seguida, ambos foram precipitados com 500 μl de solução de TCA 10% e centrifugados a 5000 g, durante 10 minutos, a 4°C e o sobrenadante descartado. Posteriormente, somente as amostras foram incubadas em temperatura ambiente, durante 30 minutos, com 500 μl de solução contendo 2,4-dinitrofenilhidrazina 10mM 18 e HCL 2M. Logo após, as amostras e os brancos foram novamente precipitados com TCA 10 % e centrifugados, durante 10 minutos, a 5000 g. Os precipitados foram, então, lavados duas vezes com solução etanol: acetato de etila (1: 1) e centrifugados a 10000 g, durante 10 minutos, a 4°C e o sobrenadante descartado. Por fim, os precipitados obtidos foram ressuscitados em 1 ml de solução de SDS 6%, novamente centrifugados a 10000 g, durante 10 minutos, a 4°C e 200 μl dos sobrenadantes foram cuidadosamente retirados e submetidos à leitura a 370 nm em leitor de placas (Thermo Scientific-MultiskanTM GO). O conteúdo de proteínas carboniladas foi expresso em ηmol de proteínas carboniladas por ml de amostra.

4.4 *Análise estatística*

As variáveis analisadas apresentaram distribuição normal no teste de Shapiro-Wilk, portanto foi realizado teste T paramétrico. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, com significância estatística considerada quando $p < 0,05$. Para análise de correlação entre as variáveis foi realizado teste de Pearson. O tratamento estatístico foi realizado através do programa GraphPad Prism 7.0 program (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA).

5 PRODUTO FINAL

5.1 Artigo Original

Evaluation of the oxidative profile in patients with Huntington's disease at different stages, in the city of Ervália/MG

ABSTRACT

Introduction: The Huntington's disease (HD) is a hereditary neurological, progressive and disabling disease, drawing attention due to its specific and impactful symptoms, such as the chorea movements. The oxidative stress presents itself as an integral agent in the pathophysiology of HD and may result in damage to cell membranes, thus compromising their integrity and viability. **Objective:** To evaluate the profile of HD patients at different stages of functional mobility and determine its relationship with hematological markers. **Material and Methods:** The survey counted with the participation of nine volunteers with HD residing in the city of Ervália/Minas Gerais. The volunteers were stratified according to the total functional mobility, using the scale UHDRS- Unified Huntington's Disease Rating Scale. Two groups were established: the first with patients at a more advanced stage and reduced functional mobility and the second with patients in less advanced stage and functional mobility still active. Hematological analyses were performed to define the red and white blood cell counts. From the serum, spectrophotometric assessments were performed to evaluate the total antioxidant capacity (TAC), determination of the activity of the enzymes Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and Glutathione-S-transferase (GST) and quantification of damage markers protein carbonyl and product of lipid peroxidation (MDA). **Results:** There were significant hematologic changes that showed that the most functionally affected group showed significantly lower levels of hemoglobin and hematocrit. Although there was no alteration in the quantification of serum total antioxidant capacity and the activity of the antioxidant enzymes SOD and GST, between the two groups assessed, the CAT enzyme activity was significantly reduced in the HD group at more advanced incapacitating stage. **Conclusion:** These findings demonstrate the relationship between oxidative stress and the HD clinical evolution, with emphasis on the depletion of antioxidant enzyme catalase and its relation with hematological markers. Pointing out this relationship as an important factor in the establishment of preventive behaviors to improve the quality of life of patients.

Evaluation of the oxidative profile in patients with Huntington's disease at different stages, in the city of Ervália/MG

Leonardo Lopes Silveira^a, Rodrigo de Barros Freitas^a, Helen Penha Gomes Pasqualon^a, Alessandra de Oliveira Faustino^b, Daniel Silva Sena Bastos^b, Leandro Licursi de Oliveira^b, Silvia Almeida Cardoso^a.

^a Postgraduate Program Professional MSc in Health Sciences, Medical and Nursing Department. Federal University of Viçosa – Minas Gerais – Brazil.

^b Postgraduate Program in Cell and Structural Biology, General Biology Department. Federal University of Viçosa - Minas Gerais – Brazil.

*Corresponding author: Silvia Almeida Cardoso, Phd, Departamento de Medicina e Enfermagem, Universidade Federal de Viçosa. 36570-900 - Viçosa, Brazil. E-mail: silvia.cardoso@ufv.br

ABSTRACT

Introduction: The Huntington's disease (HD) is a hereditary neurological, progressive and disabling disease, drawing attention due to its specific and impactful symptoms, such as the chorea movements. The oxidative stress presents itself as an integral agent in the pathophysiology of HD and may result in damage to cell membranes, thus compromising their integrity and viability. **Objective:** To evaluate the profile of HD patients at different stages of functional mobility and determine its relationship with hematological markers. **Material and Methods:** The survey counted with the participation of nine volunteers with HD residing in the city of Ervália/Minas Gerais. The volunteers were stratified according to the total functional mobility, using the scale UHDRS- Unified Huntington's Disease Rating Scale. Two groups were established: the first with patients at a more advanced stage and reduced functional

mobility and the second with patients in less advanced stage and functional mobility still active. Hematological analyses were performed to define the red and white blood cell counts. From the serum, spectrophotometric assessments were performed to evaluate the total antioxidant capacity (TAC), determination of the activity of the enzymes Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and Glutathione-S-transferase (GST) and quantification of damage markers protein carbonyl and product of lipid peroxidation (MDA). **Results:** There were significant hematologic changes that showed that the most functionally affected group showed significantly lower levels of hemoglobin and hematocrit. Although there was no alteration in the quantification of serum total antioxidant capacity and the activity of the antioxidant enzymes SOD and GST, between the two groups assessed, the CAT enzyme activity was significantly reduced in the HD group at more advanced incapacitating stage. **Conclusion:** These findings demonstrate the relationship between oxidative stress and the HD clinical evolution, with emphasis on the depletion of antioxidant enzyme catalase and its relation with hematological markers. Pointing out this relationship as an important factor in the establishment of preventive behaviors to improve the quality of life of patients.

Keywords: Huntington's disease, oxidative stress, neurodegeneration.

1. INTRODUCTION

Huntington's disease (HD) is a fatal, autosomal dominantly inherited progressive neurodegenerative disease. George Huntington first described it in 1872 as a hereditary chorea, in function of the involuntary movements presented by the patients, aggravated with the clinical evolution. Huntington disease is caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in *HTT* gene that translates into an abnormally long polyglutamine repeat in the mutant huntingtin protein (MacDonald et al., 1993; Ross and Tabrizi, 2011; Thomson and Leavitt, 2018). The manifestation of the disease occurs in adult life, between 30 and 40 years of age, with mean survival expectation of 14.5 through 20 years after the appearance of the first clinical signs in both sexes (Ross and Tabrizi, 2011). HD incidence is approximately 5- 10 in 100,000 individuals worldwide (Huang et al., 2016).

The HD symptoms vary among the disease carriers, but often include motor, cognitive and psychiatric symptoms. The cognitive symptoms already appear even before the diagnosis, and tend to progress as the disease evolves. The patients with the disease usually have

psychiatric conditions such as depression, with signs of irritability and impulsivity (Saudou and Humbert, 2016). Among the several disorders caused by HD, the chorea movements stand out and draw attention, being characterized by provoking hyperkinetic movements and fast involuntary movements (Feinstein and Walker, 2018). In addition, the progress of disease results in a gradual decline in the balance, functional mobility and can severely impact on health-related quality of life of the patients in late-state of the HD (Kloos et al., 2017).

The criteria used to diagnose the HD are: family history, due to its heredity, besides the unequivocal signs of the disease such as motor deficit (especially chorea movements), psychiatric disorders and cognitive changes, without other apparent cause. Patients who have these symptoms and characteristics are submitted to genetic testing, based on the expansion of the huntingtin (HTT) gene CAG sequence, in order to confirm the diagnosis of HD (Cheong et al., 2019). The mapping and cloning of the (HTT) gene, in 1992, was highly significant in the field of genetics, because it was the first identification of a genetic mutation associated with the disease in a previously unknown gene (Nguyen and Weydt, 2018).

The participation of the oxidative stress in the pathophysiology of HD is being described (Muller and Leavitt, 2014; Nandi et al., 2019; Túnez et al., 2011), with the participation of reactive oxygen species (ROS) in the activation of the NADPH oxidase involved in the microglia activation (Haslund-Vinding et al., 2017). The abundant presence of NO in this environment contributes to the formation of peroxynitrite radicals, highly neurotoxic (Calabrese et al., 2009). In addition, HTT mutant protein alters the energetic metabolism by the oxidative stress and calcium storage and mitochondrial depletion (Kim et al., 2010). The high susceptibility of neuronal cells to injury mediated by reactive species, as well as their high demand of oxidative metabolism and the large presence of poly-unsaturated fatty acids in neuronal membranes, contribute to the impacts of oxidative stress in the central nervous system (Halliwell, 1992).

Within this approach, the objective of this study was to demonstrate the oxidative profile of patients with HD in the city of Ervália, Minas Gerais/Brazil and its relation with hematological markers, aiming to point markers for the stratification of the disease and the establishment of possible interventions.

2. METHODOLOGY

2.1 Study design

The participants were nine volunteers with HD from the city of Ervália, Minas Gerais, Brazil. The sample included HD patients of both sexes, aged between 30 and 80 years.

The volunteers were evaluated by a physiotherapist for the determination of total functional mobility, using the UHDRS - Unified Huntington's Disease Rating Scale (Kiebertz, 1996). The patients were divided into two groups according to the disease progression: Huntington's patients in advanced stage of the disease showing decreased functional mobility (HD1); Huntington's patients with preserved functional mobility (HD2).

The samples were collected in the period from April to September 2019, after approval by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Viçosa (CEP-UFV), opinion number 3.265.178.

2.2 Collection of biological samples

The blood sample was collected by venous puncture, being carried out by duly qualified professional. Two tubes were collected of each patient, one with anticoagulant for the RBC count and WBC count by impedance and a second tube without anticoagulant for obtaining the serum. After retracting the clot, the sample was centrifuged at $2000 \times g$ and the serum was collected and stored at -4°C for later analyses.

2.3 Evaluation of the oxidative stress markers

2.3.1 Serum total antioxidant capacity

The quantification of serum total antioxidant capacity was based on the method of ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Benzie and Strain, 1996). For this purpose, 10 μl of sample/standard were added to 220 μl of FRAP solution in Polystyrene Microplates, which were incubated in the dark for 30 minutes. The oxidizing agent used was a Trolox solution, starting with a concentration of 2 mmol.L^{-1} . The readings were performed in a Multiskan GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific) at wavelength of 570 nm. The relative concentrations were obtained from the standard curve and the results were expressed in μM .

2.3.2 Antioxidant enzymes activity

Superoxide dismutase activity (SOD) was performed through the pyrogallol method, based on the ability of the enzyme to catalyze the reaction of superoxide ($O_2^{\cdot-}$) in hydrogen peroxide (Sarban et al., 2005). For this, 30 μ l of the samples were added to 99 μ l of phosphate buffer (0.1M pH 7.0), 6 μ l of MTT (1.25 mM) and 15 μ l of pyrogallol (100 μ M) in 96-well plate and incubated for 5 minutes at 37°C. The standard and the white were done in the same way, but for both without sample and using 129 μ l and 144 μ l of buffer, respectively. The white did not receive pyrogallol. After incubation, the reaction was established with 150 μ l of DMSO (1.25 mM) and the samples were submitted to reading at 570 nm in the plate reader (Thermo Scientific Multiskan TM GO). The enzymatic activity was expressed in SOD Units/mg of protein. The catalase enzyme activity was evaluated by measuring the kinetics of decomposition of H_2O_2 (Aebi, 1984). For this reason, 6 μ l of sample along with 600 μ l of phosphate buffer (0.1 M and pH 7.0) were used as white for each sample, whereas, for reading, the phosphate buffer was added to H_2O_2 (30%). Thus, in a quartz cuvette, the samples were subjected to reading at 240 nm on a spectrophotometer, during 60 seconds, for monitoring of enzyme kinetics. The enzymatic activity was expressed in Catalase Units/mg of protein.

In the determination of enzymatic activity of Glutathione-S-Transferase in the serum of volunteers was held the quantification of the product formed from the complexation of reduced glutathione (GSH) with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) (Habig et al., 1974). Thus, in a quartz cuvette were pipetted 682 μ l of phosphate buffer (0.1 M and pH 7.0) with 6 μ l of CDNB (0.1 M), 6 μ l of sample and 6 μ l of GSH solution (0.1 M) and the reaction rate of the enzyme present in the samples was monitored at 340 nm on a spectrophotometer, during 90 seconds, for monitoring of enzyme kinetics. Moreover, a white was performed for the experiment, which does not have the addition of sample and was used to check the rate of non-enzymatic reactions. The enzymatic activity was expressed as μ mol $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$, where a unit of activity represents the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 μ mol of product by minute by gram of sample, under the test conditions.

2.4 Markers of macromolecules damage

To quantify the products of lipid peroxidation (lipid peroxides, malondialdehydes and other aldehydes of low molecular weight), serum samples were submitted to the reaction with the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (Buege and Aust, 1978). In this way, 200 μ l of each sample were added to 400 μ l of solution of TBARS (15% of TCA, 0.375% of TBA and 0.25M of HCL), agitated on a vortex mixer for 10 seconds and placed in a water bath at 90°C during 40 minutes. Then, after cooling, the thiobarbituric acid reactive substances was extracted, with the addition of 600 μ l of n-butanol, followed by centrifugation at 3500 rpm for 5 minutes. Finally, after centrifugation, 200 μ l of supernatant was carefully removed and submitted to reading at 535 nm. The values of TBARS were expressed in η mols of malondialdehyde (MDA) by mg of protein.

The dosage of carbonylated proteins in serum was determined according to the methodology of Levine (Levine et al., 1990). In this way, the serum was dilute in 1:10 with phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) to the final concentration of total protein less than 10 mg/ml. Then, 200 μ l of diluted serum were mixed with 800 μ l of 10 mM 2,4- dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2.5M HCl. Sample control, white, was also prepared by adding equal volume of dilute serum to 800 μ l of 2.5 M HCl. Subsequently, the samples were incubated at ambient temperature for 1 hour in dark environmental. After this, both were precipitated with 500 μ l of TCA 40% solution and centrifuged at 5000 g for 10 minutes at 4°C and the supernatant, discarded. The precipitate was then washed twice with ethanol solution: ethyl acetate (1:1), and centrifuged at 10000 g for 10 minutes at 4°C and the supernatant, discarded. Finally, the precipitate obtained was re- suspended in 1 ml of 6% SDS solution, again centrifuged at 10000 g for 10 minutes at 4°C and 200 μ l of supernatant were carefully removed and submitted to reading at 370 nm in the plate reader (Thermo Scientific-MultiskanTM GO). The content of protein was expressed in η mol of carbonylated proteins by ml of sample.

2.5 Statistical analysis

The analyzed variables had a normal distribution on the Shapiro-Wilk test. The T parametric test was performed. The results were expressed as mean \pm standard deviation, with statistical significance considered when $p < 0.05$. For the analysis of correlation between the variables Pearson test was performed. The statistical analysis was performed using the software GraphPad Prism 7.0 program (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

3. RESULTS

The study participants were 09 volunteers from the city of Ervália, Minas Gerais, Brazil with prior diagnosis of Huntington's disease, whose functional mobility was assessed by the UHDRS - Unified Huntington's Disease Rating Scale. Among the individuals of the HD1 group, three were of female sex and two of male sex, whereas in the HD2 group, all individuals were male.

The hematological profile of all individuals is showed in Table 1. The subjects in HD1 group feature values significantly impaired for the parameters related to the red blood cells in comparison to individuals from the HD2 group. In relation to the white blood cells, only the lymphocytes count showed a significant difference, with values significantly increased in the HD1 group in comparison to the HD2 group. However, there was no lymphocytes count above the reference values in both groups evaluated.

Table 1 – Hematological profile of volunteers Huntington's Disease carriers

Parameters	HD1 (n=5)	HD2 (n=4)	<i>p</i>
Platelet (mm ³)	286 ± 12.73	238.30 ± 41.41	0.2618
Erythrocyte (M/mm ³)	441.20 ± 20.57	502.30 ± 17.75	0.0660
Hemoglobin (g/dL)	130.80 ± 2.55	146.80 ± 2.86	0.0043**
Hematocrit (%)	39,7 ± 7.19	43,780 ± 8.74	0.0083**
Leukocyte (mm ³)	6580 ± 997.70	5525 ± 604.70	0.4265
Lymphocyte (mm ³)	2063 ± 90.44	1572 ± 167.20	0.0287*
Neutrophil (mm ³)	4015 ± 864.60	3542 ± 400.20	0.6630
Basophil (mm ³)	2 ± 2	0 ± 0	0.4071
Eosinophil (mm ³)	50.20 ± 31.13	25 ± 15.24	0.5258
Monocyte (mm ³)	451.20 ± 74.73	386.80 ± 42.33	0.5086

Data are expressed as mean ± sd

Among the evaluated parameters of the red blood cells, 60% of individuals from the HD1 group, with reduced functional mobility, had erythrocyte, hemoglobin and hematocrit count levels below the reference in relation to sex and age. Figure 1 shows a biological tendency of reduction in erythrocyte count in the HD1 group with $p = 0.0660$.

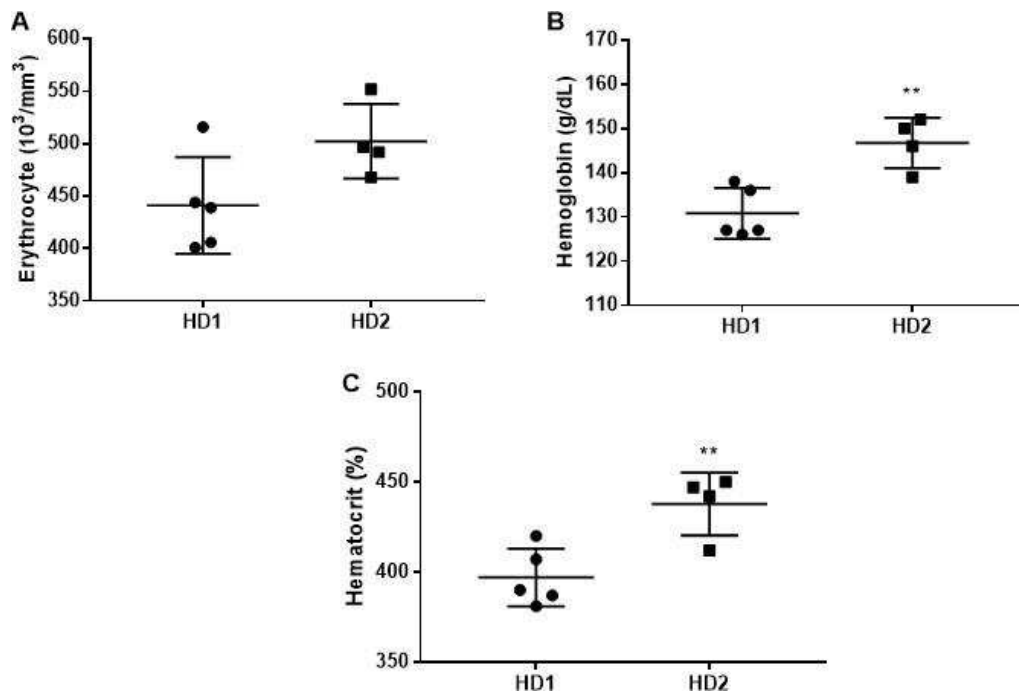


Figure 1: Evaluation of patients with Huntington's disease. Erythrocyte (A), hemoglobin (B), hematocrit (C) in HD patients with impaired functional mobility. ** $p < 0.01$ T test.

For the evaluation of the serum oxidative profile of volunteers, initially, there was the determination of the total antioxidant capacity by ferric reduction (FRAP). Figure 2A shows that there was no difference in serum total antioxidant capacity between the groups evaluated.

In the evaluation of the antioxidant enzymes activity, the serum activity of the enzymes superoxide dismutase and glutathione-S-transferase (Figure 2B and C) showed no difference between the two groups evaluated. The catalase enzyme activity, in turn, was significantly lower in the group with HD1 patients in comparison to HD2 group. (Figure 2D).

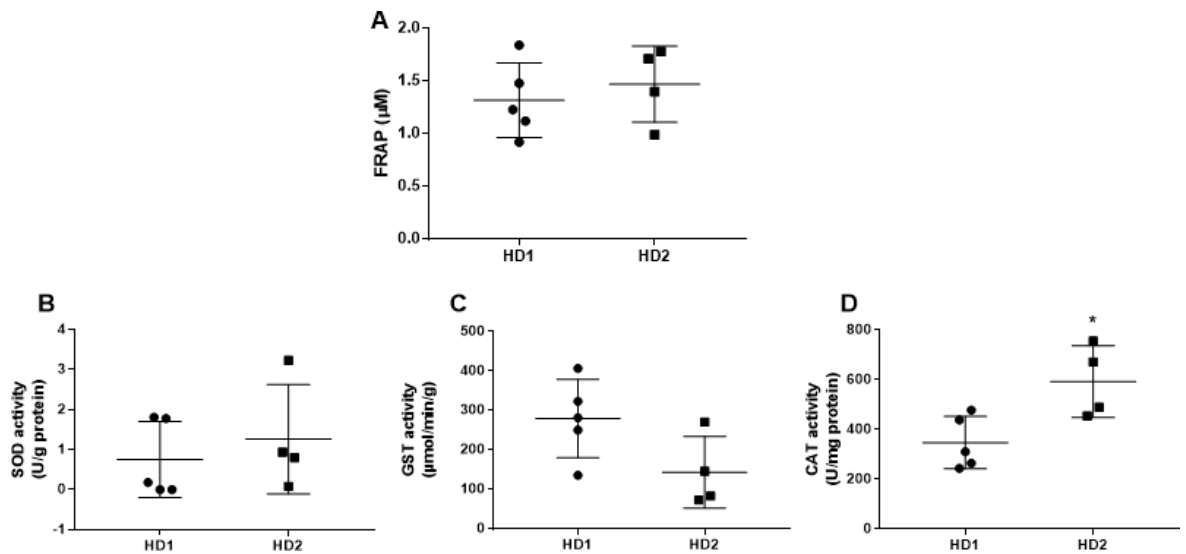


Figure 2: Assessment of the oxidative profile. (A) total antioxidant capacity by ferric reduction (FRAP), and activity of antioxidant enzymes SOD (B), GST (C) and CAT (D). * $p < 0.05$ T test.

In relation to markers of tissue damage resulting from oxidative stress there was the quantification of lipid peroxidation and protein carbonyl. The MDA marker resulting from lipid peroxidation showed no significant alteration in the HD1 group in comparison to the HD2 group (Figure 3A), as well as, the quantification of the carbonyl protein (Figure 3B).

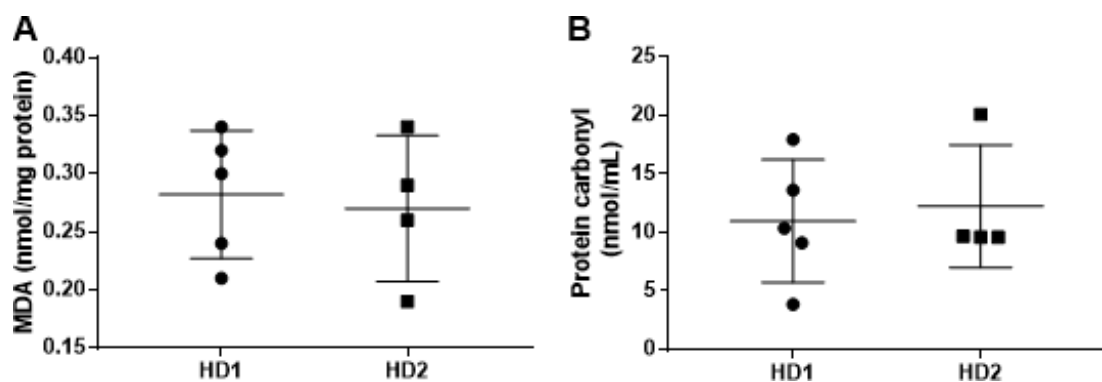


Figure 3: Quantification of damage markers related to oxidative stress.

(A) MDA and (B) protein carbonyl.

Subsequently, the statistical correlation between the activity of the catalase antioxidant enzyme and hematological variables was evaluated. There was a positive correlation between the catalase activity and the quantification of hemoglobin (Figure 4A) and the percentage of hematocrit (Figure 4B) only for the individuals from the HD1 group with decreased of functional mobility, relationship that was not established for individuals from the HD2 group with preserved functional mobility.

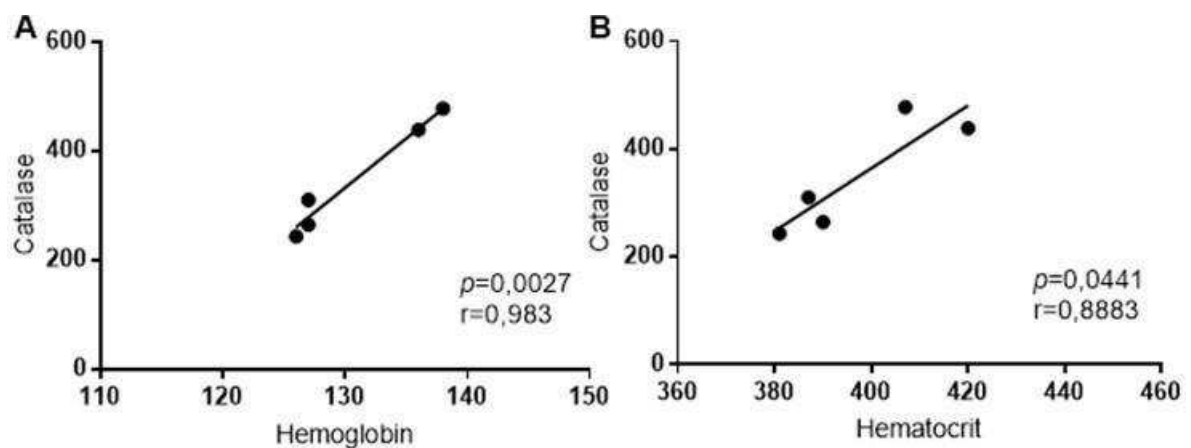


Figure 4: Correlation analysis. Pearson test between the variable catalase (CAT) activity and hematological parameters; hemoglobin (A) and hematocrit (B).

4. DISCUSSION

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disease caused by the expansion of the CAG sequence in the huntingtin gene. The Huntington patient develops several symptoms such as, highlighting cognitive changes, psychiatric disorders (i.e. depression, irritability and apathy) in addition to abnormalities such as altered gait, the facial expression with chorea movements is the most visible and memorable change (MacDonald et al., 1993; Saudou and Humbert, 2016). Other motor impairments appear in an advanced phase of the disease, with the bradykinesia and rigidity of movements. For better diagnosis of the disease, there is need for the genetic laboratory analysis, in addition to the clinical diagnosis (Cheong et al., 2019).

Agostinho and colleagues, identified in *Ervália/Minas Gerais/Brazil* four large families apparently affected by Huntington's disease (Agostinho et al., 2015). Among the 32 individuals tested, 20 confirmed the presence of the HD mutant gene. In this study, the HD prevalence determined to *Ervália* was of 7.2/10,000. This prevalence is approximately 10 times greater than the estimated prevalence in the Caucasian population of Europe and North America, with, respectively, 0.5 and 0.7/10,000 inhabitants (Agostinho et al., 2015).

The present study recruited nine HD carriers from the city of *Ervália/MG*, belonging to families identified in the study of Agostinho (Agostinho et al., 2015). These individuals were classified according to the instrument for the assessment of functional total mobility, in unified scale for assessment of Huntington's disease, to relate this variable with its oxidative profile. Our data demonstrated that patients with HD in advanced stage and functionally incapacitating present significant changes in blood cell profile, with emphasis on reduced red blood cells and increased lymphocytes in relation to the group with preserved functional mobility.

The reduced levels of red blood cells indicate that HD1 patients are anemic and the deregulation of iron are associated with increased oxidative stress in the brain; the free iron catalyzes the conversion of hydrogen peroxide into highly reactive hydroxyl radicals (Muller and Leavitt, 2014). Another factor that may be related to the anemic condition presented by patients with lower mobility is the difficulty in chewing and swallowing, which interferes with the nutritional ability, a fact already described even in moderate stages of patients with Huntington's disease (Montagut et al., 2014). In addition to changes in levels of red blood cells, the blood profile showed an increase in lymphocytes. This increase is associated to prolonged inflammation profile triggered by the disease (Crotti and Glass, 2015; Weiss, 2009)

Oxidative stress is characterized as an imbalance between the production of reactive species and the antioxidant system in aerobic organisms (Túnez et al., 2011). For evaluation of the oxidative profile, initially, there was the determination of the serum total antioxidant capacity (FRAP) whose levels were equal between both groups evaluated, similarly to what has been described for patients with other neurodegenerative conditions such as Alzheimer's Disease (Pulido et al., 2005). The low mobility was not able to change the activity of the other antioxidant enzymes, SOD and GST.

The catalase activity was significantly lower in the most affected group in comparison to the group whose functional mobility is preserved. Patients in early stage of the disease have higher quality of life, nutritional status and can control oxidative imbalance. Catalase is an

important enzyme involved in the neutralization of free radicals (Nandi et al., 2019). Its activity modulates the influx of calcium through ion channels, induced by oxidative stress, in neural cells. Several studies have demonstrated altered catalase in degenerative alterations in the central nervous system (Nazıroğlu et al., 2012). HD patients with low mobility showed increase in CAT activity indicating a pro oxidative status. The mobility was negative correlated with the functional assessment, the independence scale and the functional capacity (Tumas et al., 2004), corroborating with the oxidative changes.

There was greater consumption of catalase in the group of individuals more affected by HD and presenting a picture of altered hemoglobin and hematocrit, which suggests anemia. These same individuals also presented a higher number of lymphocytes in relation to the group less affected, which suggests an activation of the inflammatory response.

The membranes present in the cells and cell organelles are composed of poly-unsaturated fatty acids, the component most attacked by ROS, scenario that can induce lipid peroxidation and generation of various molecules typically electrolyte, such as the MDA. This process can cause a modulation of metabolic pathways, which results in destruction and collapse of cell metabolism (Lima and Abdalla, 2001). The increased of MDA levels in HD patients in comparison to sex- and age-paired without neurological changes, as well as increased MDA correlated with the severity of the HD (Chen et al., 2007). In relation to markers of tissue damage resulting from oxidative stress, we determined the lipid peroxidation through quantification of MDA and carbonylation of serum proteins. There was no significant change in the quantification of serum MDA and the carbonylation of proteins between the two groups with Huntington's disease evaluated. This differs from the findings of Túnez and colleagues (Túnez et al., 2011) that demonstrated the correlation of increased carbonylation of proteins with the HD stage. The increase in CAT activity and maintenance of SOD and GST activity, even in patients with low mobility, may have to contribute to cell protection.

Our data demonstrate a positive correlation between the decay of the positivity of catalase, and smaller hematological indices for individuals in the group of patients who present more severe functional changes related to HD. Evincing that this group with hematological changes have a greater impact on the oxidative profile. Several therapeutic strategies have been proposed for the treatment of HD, in which the mitochondrial dysfunction and oxidative damage play an important pathogenic role, such as Coenzyme Q10 and creatine, exactly aiming to reduce the formation of ROS (Stack et al., 2008). Although the body has effective

antioxidant defenses to neutralize free radicals, which include the enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione, some physiological situations promote oxidative stress, in which the supplementation with exogenous antioxidants presents relevant importance to maintain the balance between pro and anti-oxidants (Halliwell and Gutteridge, 2015).

5. CONCLUSION

Within this approach, our findings demonstrate that markers related to the oxidative profile together with other hematological markers can assist in the stratification of the disease and in the establishment of early interventions.

DECLARATION OF COMPETING INTEREST

All authors claim that there are no conflicts of interest.

FUNDING

This work was supported by the research grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais [grant number: APQ-01023-18].

ACKNOWLEDGEMENTS

We are extremely grateful to all the patients who participated in the study and the team of Specialized Healthcare Unit at the Universidade Federal de Viçosa/Minas Gerais.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Leonardo Silveira: Writing - Original Draft and Formal analysis; **Rodrigo Freitas:** Conceptualization; **Alessandra Faustino:** Formal analysis; **Helen Pasqualon:** Formal analysis; **Daniel Bastos:** Formal analysis, Writing - Original Draft; **Leandro Oliveira:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Resources, Funding acquisition, Writing - Original Draft; **Silvia Cardoso:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Resources, Funding acquisition, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing, Project administration, Supervision.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Agostinho, L.D.A., da Silva, I. dos S., Maia, L.A., Azevedo, M. de A., Faria, T.M.R. de O., Apolinario, T.A., Pereira, S.P., Reis, R. de L., dos Santos, S.R., Paiva, C.L.A., 2015. A Study of a Geographical Cluster of Huntington’s Disease in a Brazilian Town of Zona da Mata, Minas Gerais State. *Eur. Neurol.* 74, 62–68. <https://doi.org/10.1159/000434630>
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302–310. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
- Calabrese, V., Cornelius, C., Rizzarelli, E., Owen, J.B., Dinkova-Kostova, A.T., Butterfield, D.A., 2009. Nitric Oxide in Cell Survival: A Janus Molecule. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2717–2739. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2721>
- Chen, C.-M., Wu, Y.-R., Cheng, M.-L., Liu, J.-L., Lee, Y.-M., Lee, P.-W., Soong, B.-W., Chiu, D.T.-Y., 2007. Increased oxidative damage and mitochondrial abnormalities in the peripheral blood of Huntington’s disease patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359, 335–340. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.05.093>
- Cheong, R.Y., Gabery, S., Petersén, Å., 2019. The Role of Hypothalamic Pathology for Non-Motor Features of Huntington’s Disease. *J. Huntingtons. Dis.* 8, 375–391. <https://doi.org/10.3233/JHD-190372>

- Crotti, A., Glass, C.K., 2015. The choreography of neuroinflammation in Huntington's disease. *Trends Immunol.* 36, 364–373. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.04.007>
- Feinstein, E., Walker, R., 2018. An Update on the Treatment of Chorea. *Curr. Treat. Options Neurol.* <https://doi.org/10.1007/s11940-018-0529-y>
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Halliwell, B., 1992. Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System. *J. Neurochem.* 59, 1609–1623. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb10990.x>
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine, Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press, Oxford. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>
- Haslund-Vinding, J., McBean, G., Jaquet, V., Vilhardt, F., 2017. NADPH oxidases in oxidant production by microglia: activating receptors, pharmacology and association with disease. *Br. J. Pharmacol.* 174, 1733–1749. <https://doi.org/10.1111/bph.13425>
- Huang, W.-J., Chen, W.-W., Zhang, X., 2016. Huntington's disease: Molecular basis of pathology and status of current therapeutic approaches. *Exp. Ther. Med.* 12, 1951–1956. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3566>
- Kiebertz, K., 1996. Unified Huntington's disease rating scale: Reliability and consistency. *Mov. Disord.* 11, 136–142. <https://doi.org/10.1002/mds.870110204>
- Kim, J., Moody, J.P., Edgerly, C.K., Bordiuk, O.L., Cormier, K., Smith, K., Beal, M.F., Ferrante, R.J., 2010. Mitochondrial loss, dysfunction and altered dynamics in Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3919–3935. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq306>
- Kloos, A.D., Kegelmeyer, D.A., Fritz, N.E., Daley, A.M., Young, G.S., Kostyk, S.K., 2017. Cognitive Dysfunction Contributes to Mobility Impairments in Huntington's Disease. *J. Huntingtons. Dis.* 6, 363–370. <https://doi.org/10.3233/JHD-170279>
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464–478. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-H)
- Lima, É.S., Abdalla, D.S.P., 2001. Peroxidação lipídica: Mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev. Bras. Ciências Farm. J. Pharm. Sci.* 37, 293–303.
- MacDonald, M.E., Ambrose, C.M., Duyao, M.P., Myers, R.H., Lin, C., Srinidhi, L., Barnes, G., Taylor, S.A., James, M., Groot, N., MacFarlane, H., Jenkins, B., Anderson, M.A., Wexler, N.S., Gusella, J.F., Bates, G.P., Baxendale, S., Hummerich, H., Kirby, S., North, M., Youngman, S., Mott, R., Zehetner, G., Sedlacek, Z., Poustka, A., Frischauf, A.-M., Lehrach, H., Buckler, A.J., Church, D., Doucette-Stamm, L., O'Donovan, M.C.,

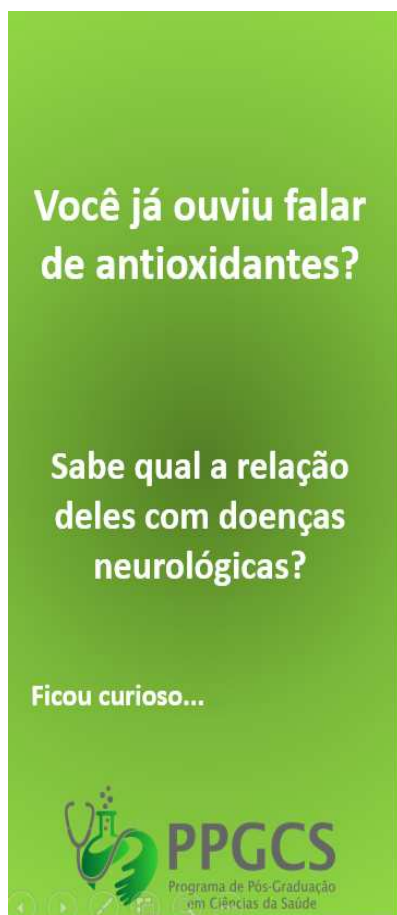
- Riba-Ramirez, L., Shah, M., Stanton, V.P., Strobel, S.A., Draths, K.M., Wales, J.L., Dervan, P., Housman, D.E., Altherr, M., Shiang, R., Thompson, L., Fielder, T., Wasmuth, J.J., Tagle, D., Valdes, J., Elmer, L., Allard, M., Castilla, L., Swaroop, M., Blanchard, K., Collins, F.S., Snell, R., Holloway, T., Gillespie, K., Datson, N., Shaw, D., Harper, P.S., 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72, 971–983. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90585-E](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90585-E)
- Montagut, N., Gazulla, D., Barreiro, S., Muñoz, E., 2014. La disfagia en la enfermedad de Huntington: Propuesta de intervención logopédica. *Rev. Logop. Foniatr. y Audiol.* 34, 81–84. <https://doi.org/10.1016/j.rlfa.2013.04.009>
- Muller, M., Leavitt, B.R., 2014. Iron dysregulation in Huntington's disease. *J. Neurochem.* 130, 328–350. <https://doi.org/10.1111/jnc.12739>
- Nandi, A., Yan, L.J., Jana, C.K., Das, N., 2019. Role of Catalase in Oxidative Stress- And Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9613090>
- Nazıroğlu, M., Dikici, D.M., Dursun, Ş., 2012. Role of Oxidative Stress and Ca²⁺ Signaling on Molecular Pathways of Neuropathic Pain in Diabetes: Focus on TRP Channels. *Neurochem. Res.* 37, 2065–2075. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0850-x>
- Nguyen, H.H.P., Weydt, P., 2018. Huntington-Erkrankung. *medizinische Genet.* 30, 246–251. <https://doi.org/10.1007/s11825-018-0190-6>
- Pulido, R., Jiménez-Escrig, A., Orensanz, L., Saura-Calixto, F., Jiménez-Escrig, A., 2005. Study of plasma antioxidant status in Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* 12, 531–535. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2005.01000.x>
- Ross, C.A., Tabrizi, S.J., 2011. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol.* 10, 83–98. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70245-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70245-3)
- Sarban, S., Kocyigit, A., Yazar, M., Isikan, U.E., 2005. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin. Biochem.* 38, 981–986. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.08.003>
- Saudou, F., Humbert, S., 2016. The Biology of Huntingtin. *Neuron.* <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.003>
- Stack, E.C., Matson, W.R., Ferrante, R.J., 2008. Evidence of Oxidant Damage in Huntington's Disease: Translational Strategies Using Antioxidants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1147, 79–92. <https://doi.org/10.1196/annals.1427.008>
- Thomson, S.B., Leavitt, B.R., 2018. Transcriptional regulation of the huntingtin gene. *J. Huntingtons. Dis.* 7, 289–296. <https://doi.org/10.3233/JHD-180331>

- Tumas, V., Camargos, S.T., Jalali, P.S., Galesso, A. de P., Marques Jr, W., 2004. Internal consistency of a Brazilian version of the unified Huntington's disease rating scale. *Arq. Neuropsiquiatr.* 62, 977–982. <https://doi.org/10.1590/S0004-282X2004000600009>
- Túnez, I., Sánchez-López, F., Agüera, E., Fernández-Bolaños, R., Sánchez, F.M., Tasset-Cuevas, I., 2011. Important Role of Oxidative Stress Biomarkers in Huntington's Disease. *J. Med. Chem.* 54, 5602–5606. <https://doi.org/10.1021/jm200605a>
- Weiss, G., 2009. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1790, 682–693. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.08.006>

DECLARATION OF COMPETING INTEREST

All authors claim that there are no conflicts of interest

5.2 Produto Técnico - Folder explicativo



AUTORES

Leonardo Lopes Silveira (discente PPGCS)

Caroline Corrêa da Rocha (discente PPGCS)

Helen Penha Gomes Pasqualon (discente PPGCS)

Silvia Almeida Cardoso (orientadora)



QUEM PODE TE AJUDAR:



<https://muitossomosraros.com.br/>



<https://abh.atendimento@abh.org.br>



<https://www.saude.gov.br/>

VOCÊ CONHECE OS SEUS DIREITOS?

PORTARIA Nº 199, DE 30 DE JANEIRO DE 2014
 Institui a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras, aprova as Diretrizes para Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) e institui incentivos financeiros de custeio.

O que são doenças neurológicas?



Fonte: Mauro Souza/ Súper Interessante

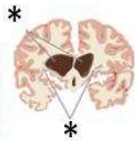
São doenças que afetam o cérebro, a medula espinhal e os nervos.

Elas podem ser degenerativas ou não degenerativas.

E a doença de Huntington?

A doença de Huntington (DH) é uma condição neurodegenerativa hereditária, onde a região central do cérebro é a mais afetada*.

Filhos que tenham um dos pais afetado pela DH têm 50% de chances de desenvolver a doença em algum momento de sua vida.



Fonte: Shutterstock.com (adaptado)

A DH atinge homens e mulheres, os primeiros sintomas aparecem lentamente entre os 30 e 50 anos. Como alterações motoras, no humor e até mesmo no raciocínio ou memória.

E depois do diagnóstico?

Não existe cura para esta doença.



Fonte: muitossomosraros.com.br

O objetivo dos tratamentos é retardar o aparecimento dos sintomas, manter o doente ativo e saudável.

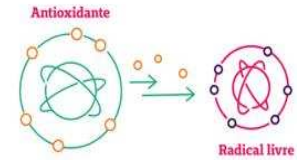


Fonte: blogfisioterapia.com.br/doenca-de-huntington/

Por isso a fisioterapia é tão importante!

E onde entram os antioxidantes?

ANTIOXIDANTES são substâncias que protegem as células contra a ação deletéria dos radicais livres.



Fonte: www.centralnacionalunimed.com.br/viver-bem/alimentacao/o-que-sao-antioxidantes-

E por isso são indicados para a prevenção de várias doenças.

MUITOS ESTUDOS INDICAM QUE OS ANTIOXIDANTES REDUZEM OS DANOS CAUSADOS PELOS RADICAIS LIVRES EM DOENÇAS DEGENERATIVAS.



Mas como consumir ANTIOXIDANTES?

Mantendo uma dieta rica em: brócolis, uva passa, espinafre, tomate, limão, amora, nozes, repolho roxo, alho, morango, ameixa, abacate, feijão vermelho e cúrcuma.

Fonte: <http://centroclinicoacras.com.br/>

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos podemos concluir que:

- Os pacientes com DH que apresentam uma capacidade funcional reduzida, apresentaram contagem de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito mais baixo em relação ao grupo menos acometido funcionalmente.

- Os dois grupos com DH avaliados, não apresentaram diferenças estatísticas de FRAP, ou seja, não houve diferença na capacidade antioxidante total sérica entre os grupos avaliados.

- Os pacientes com DH avançada e funcionalmente comprometidos, demonstraram reduções significativas nos níveis de CAT em amostras de sangue.

- O marcador MDA resultante da peroxidação lipídica não apresentou significativa alteração no grupo DH1 em comparação com o grupo DH2, assim como observado para a quantificação da proteína carbonilada

- Houve uma correlação positiva entre a atividade da CAT e a quantificação de hemoglobina e porcentagem de hematócrito apenas para os indivíduos do grupo DH1 com menor capacidade funcional, essa relação não se estabeleceu para os indivíduos do grupo DH2 com capacidade funcional ainda preservada.

- O presente estudo, servirá de base para que futuros estudos, sobre o mesmo tema ou algo semelhante, consigam encontrar significativos progressos em busca da cura da doença de Huntington ou tratamentos que tenham a finalidade de atenuar os impactos danosos da doença.

Foi realizado a construção de um folheto explicativo com a finalidade de informar os familiares e portadores de DH da cidade de Ervália/MG, a respeito das características mais comuns da doença, bem como o que é e qual a sua relação com o estresse oxidativo. Além de orientações alimentares em relação à capacidade antioxidante.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105: 121-126. 1984.
- AGOSTINHO, L. DE A. et al. A Study of a Geographical Cluster of Huntington's Disease in a Brazilian Town of Zona da Mata, Minas Gerais State. **European Neurology**, v. 74, n. 1-2, p. 62-68, 2015.
- BARBOSA, et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Rev. Nutr.** vol 23 (4): 629-643, 2010.
- BENZIE, IF; STRAIN, JJ. The plasm iron reduction capacity (FRAP) as measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal. Biochem**, v. 239 , 70 - 76, 1996.
- BUEGE, JA; AUST SD. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**; 52:302-310, 1978.
- BURKE et al. Aggregation of synuclein by dopal, the monoamine oxidative metabolite of dopamine. **Acta neurophatol** 115: 193-203, 2018.
- CALABRESE, V. et al. Nitric oxide in cell survival: a janus molecule. **Antioxided. Redox Signal.** 11, 2717-2739, 2009.
- CHEN, C M et al. Increased oxidative damage and mitochondrial abnormalities in the peripheal blood of Huntington's diseases patients. **Biochemical and biophysical research communications.** Vol. 359, pp 335-340. 27 jul 2017.
- CHEONG, R. Y.; GABERY, S.; PETERSÉN, ÅSA. The Role of Hypothalamic Pathology for Non-Motor Features of Huntington's Disease. **Journal of Huntington's Disease**, v. Preprint, n. Preprint, p. 1-17, 26 set. 2019.
- CHITNIS, T.; WEINER, H. L. CNS inflammation and neurodegeneration. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, n. 10, p. 3577-3587, 2 out. 2017.
- FEINSTEIN, E.; WALKER, R. An Update on the Treatment of Chorea. **Current Treatment Options in Neurology**, v. 20, n. 10, p. 44, 25 out. 2018.
- GUSELLA, J. F.; MACDONALD, M. E. Huntington's disease: the case for genetic modifiers. **Genome Medicine**, v. 1, n. 8, p. 80, 21 ago. 2009.
- GUTTERIDGE, J. M. C. The role of superoxide and hydroxyl radicals in phospholipid peroxidation catalysed by iron salts. **FEBS Letters.** v.150, p. 454-458, 1982
- HABIG WH, PABST MJ, JOKOBY WB. Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem**; 249:7130-7139, 1974.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J. Neurochem.** 59, 1609-1623, 1992.
- HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, JMC. Free Rad. in Biol. and Med. 3 ed. Clarendon. Oxford, 2000.
- JĘDRAK, P. et al. Mitochondrial alterations accompanied by oxidative stress conditions in skin

fibroblasts of Huntington's disease patients. **Metabolic brain disease**, v. 33, n. 6, p. 2005–2017, 2018.

KIM, H. et al. Survival of Korean Huntington's Disease Patients. **Journal of movement disorders**, v. 9, 166-170, 2016.

LEVINE RL, GARLAND D, OLIVER CN. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in enzymology** 186: 464-478. 1990.

LIMA, É. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 37, n. 3, 2001.

MCCOLGAN, P.; TABRIZI, S. J. Huntington's disease: a clinical review. **European Journal of Neurology**, v. 25, n. 1, p. 24–34, 1 jan. 2018

MONTAGUT, N; GAZULLA, D; BARREIRO, S; MUÑOZ, E. La disfagia en la enfermedad de Huntington: propuesta de intervención logopédica. Ver **Logopedia, Foniatria y Audiología**, 34(2):81-4, 2014.

MULLER, M; LEVITT, R. Iron dysregulation in Huntington's Diseases. **Journal of Neurochemistry**, 130, 328-350, 2014.

NAZIROGLU, M. Molecular role of catalase in Ca²⁺ signaling induced by oxidative stress and activation of the TRP cation channel in the nervous system, **Journal of Receptors and Signal Transduction**, 32: 3, 134-141, 2012.

NGUYEN, H. H. P.; WEYDT, P. Huntington-Erkrankung. **medizinische genetik**, v. 30, n. 2, p. 246–251, 2 jun. 2018.

PALMIERI, B ; SBLENDORIO, V. **Oxidative stress tests: overview of reliability and use - Part 1**. Eur Ver Med Pharmacol Sci, 11 : 5. p. 309-342, 2007.

PULIDO R, et al. Study of plasma antioxidant status in alzheimers diseases. **Eur J Neurol**, 12: 531-535, 2005.

QIN L, et al. NADPH oxidase and aging drive microglial activation, oxidative stress, and dopaminergic neurodegeneration following systemic LPS administration. **Glia** 61, 855-868, 2013. .

SARBAN S, et al. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Clin Biochem**, 38:981–986, 2005.

SAUDOU, F.; HUMBERT, S. The Biology of Huntingtin. **Neuron**, v. 89, n. 5, p. 910–926, 2 mar. 2016.

STACK, EC, MATSON, WR, FERRANTE, RJ. Evidence of oxidant damage in Huntington's diseases: Translational strategies using antioxidants. **Annals of the New York academy of sciences**. 1147: 79-92, dez 2008.

TÚNEZ, I. et al Important role of oxidative stress biomarkers in Huntington diseases **J. Med. Chem.**, 54. pp. 5602-5606 ,2011.

VASCONCELOS, SML, et al. Reactive species of oxygen and nitrogen, antioxidants and oxidative damage markers in human blood: Main analytical methods for their determination. **Quimica Nova**, 30, 1323, 2007.

8 ANEXOS

8.1 ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo

Brain Research Bulletin

Evaluation of the oxidative profile in patients with Huntington's disease at different stages, in the city of Ervália/MG

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Neurodegenerative and Neuroinflammatory Disorders
Keywords:	Huntington's disease; oxidative stress; neurodegeneration
Corresponding Author:	Silvia Almeida Cardoso, Ph.D. Universidade Federal de Viçosa-UFV Vicosa, MG Brazil
First Author:	Leonardo Lopes Silveira
Order of Authors:	Leonardo Lopes Silveira
	Rodrigo de Barros Freitas
	Helen Penha Gomes Pasqualon
	Alessandra de Oliveira Faustino
	Daniel Silva Sena Bastos
	Leandro Licursi de Oliveira
	Silvia Almeida Cardoso, Ph.D.

<p>Abstract:</p>	<p>Introduction</p> <p>The Huntington's disease (HD) is a hereditary neurological, progressive and disabling disease, drawing attention due to its specific and impactful symptoms, such as the chorea movements. The oxidative stress presents itself as an integral agent in the pathophysiology of HD and may result in damage to cell membranes, thus compromising their integrity and viability.</p> <p>Objective</p> <p>To evaluate the profile of HD patients at different stages of functional mobility and determine its relationship with hematological markers.</p> <p>Material and Methods</p> <p>The survey counted with the participation of nine volunteers with HD residing in the city of Ervália/Minas Gerais. The volunteers were stratified according to the total functional mobility, using the scale UHDRS- Unified Huntington's Disease Rating Scale. Two groups were established: the first with patients at a more advanced stage and reduced functional mobility and the second with patients in less advanced stage and functional mobility still active. Hematological analyses were performed to define the red and white blood cell counts. From the serum, spectrophotometric assessments were performed to evaluate the total antioxidant capacity (TAC), determination of the activity of the enzymes Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and Glutathione-S-transferase (GST) and quantification of damage markers protein carbonyl and product of lipid peroxidation (MDA).</p> <p>Results</p> <p>There were significant hematologic changes that showed that the most functionally affected group showed significantly lower levels of hemoglobin and hematocrit. Although there was no alteration in the quantification of serum total antioxidant capacity and the activity of the antioxidant enzymes SOD and GST, between the two groups assessed, the CAT enzyme activity was significantly reduced in the HD group</p>
-------------------------	---

	<p>at more advanced incapacitating stage.</p> <p>Conclusion</p> <p>These findings demonstrate the relationship between oxidative stress and the HD clinical evolution, with emphasis on the depletion of antioxidant enzyme catalase and its relation with hematological markers. Pointing out this relationship as an important factor in the establishment of preventive behaviors to improve the quality of life of patients.</p>
Suggested Reviewers:	<p>Christopher A Ross Johns Hopkins University School of Medicine ca.ross@jhu.edu Work with Huntington's Disease</p> <p>Usha Rajamma National Institutes of Health ushar@iucbr.ac.in</p> <p>Kara J Wyant University of Michigan Medical School wyantk@med.umich. edu</p>
Opposed Reviewers:	

8.2 ANEXO B - Teste de capacidade funcional para DH**ESCALA DE CAPACIDADE FUNCIONAL TOTAL (UHDRS)**

Nome: _____
Sexo: () Masculino () Feminino
Data de nascimento: _____ / _____ / _____ Idade: _____ anos
Estudos/ Profissão: _____
Observações: _____

1- ATIVIDADE DA VIDA DIÁRIA

- 0 = Necessidade de ajuda para tudo
- 1 = Capaz apenas das atividades mais simples
- 2 = Leve comprometimento
- 3 = Normal

2- CUIDADOS EXIGIDOS

- 0 = Necessita o tempo todo de cuidados especializados de enfermagem
- 1 = Necessidade continuamente de cuidados
- 2 = Cuidado em casa

3- OCUPAÇÃO

- 0 = Incapaz de trabalhar
- 1 = Capaz apenas das serviços auxiliares
- 2 = Capacidade reduzida no seu trabalho habitual
- 3 = Normal

4- FINANÇAS

- 0 = Incapaz
- 1 = Muita ajuda
- 2 = Pouca ajuda
- 3 = Normal

5- TAREFAS DOMÉSTICAS

- 0 = Incapaz
- 1 = Comprometido
- 2 = Normal

PONTUAÇÃO TOTAL- (0-13 pontos)

TFC- PONTUAÇÃO TOTAL	ESTÁGIOS
11 - 13	I
7 -10	II
3 - 6	III
1 - 2	IV
0	V

Shoulson and Fahn Staging Scale

Escala traduzida e enviada por Prof. Dr. Vitor Tumas Setor de Distúrbios do Movimento e Neurologia Comportamental Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Ribeirão Preto – SP 1 de novembro de 2018.

8.3 ANEXO C - Aprovação do projeto pelo CEP - UFV

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do perfil oxidativo em pacientes com doença de Huntington em diferentes estágios, na cidade de Ervália-MG

Pesquisador: Rodrigo de Barros Freitas

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 04623218.3.0000.5153

Instituição Proponente: Departamento de Medicina e Enfermagem

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.265.178

Apresentação do Projeto:

O presente protocolo foi enquadrado como pertencente à área Grande Área 4. Ciências da Saúde. Segundo Formulário Online "Trata-se de um estudo transversal e experimental, o que se justifica pelo fato de compararmos, através da análise sanguínea, o estresse oxidativo de pacientes com doença de Huntington, em diferentes estágios de progressão da doença, na cidade de Ervália MG. Na cidade de Ervália MG, alguns casos de doença de Huntington já foram diagnosticados. Para essa pesquisa, todas as pessoas já diagnosticadas serão abordadas e convidadas a participar da pesquisa e a partir daí, serão pesquisados todos os pacientes que aceitarem participar do estudo. Para a elaboração do estudo será analisada a história da doença, os aspectos clínicos, fisiopatológicos, um estudo epidemiológico, na cidade de Ervália MG. Será inicialmente selecionado para a pesquisa, um grupo aproximado de dez pacientes que já foram diagnosticados com a doença de Huntington na cidade de Ervália. Em seguida os pacientes serão analisados, através da aplicação da avaliação de capacidade funcional total (TFC) da UHDRS - Unified Huntingtons Disease Rating Scale (Escala unificada para avaliação da doença de Huntington, trata-se de uma escala de avaliação confiável e eficiente e assim separar as pessoas em grupos onde os sintomas da doença sejam iniciais e nos casos onde a doença está mais avançada. A aplicação da avaliação será feita em um ambiente reservado, garantindo a privacidade do paciente. Serão colhidas amostras de sangue dos pacientes (10 ml), para posterior análise em laboratório, essas amostras serão comparadas para vermos o perfil da análise do estresse oxidativo dos pacientes e

qual as características em diferentes estágios da doença. As amostras de sangue serão levadas a um processo de centrifugação para retirada do soro. Em seguida serão utilizados biomarcadores de danos oxidantes. A determinação da atividade catalítica da SOD será determinada pelo método do pirogalol baseado na capacidade da enzima de catalisar a reação do superóxido (O₂) e peróxido de hidrogênio (MARKLUND S; MARKLUND G, 1974). Para determinar a atividade enzimática da Glutationa S-transferase presente nos soros dos pacientes serão realizadas a quantificação do produto formado a partir da complexação de glutatona reduzida (GSH) com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (HAGIB; PABST; JAKOBY, 1974), e será calculada pela taxa de oxidação de NADPH. De acordo com o método Griess, o óxido nítrico será indiretamente mensurado estimando a concentração de nitrito no soro dos pacientes. Para quantificar os produtos provenientes da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeídos e demais aldeídos de baixo peso molecular), o soro dos pacientes serão submetidos à reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Seguindo a metodologia de Levine, avaliaremos a oxidação de proteínas por carbonilação e, conseqüentemente, o dano oxidativo às proteínas, a concentração de proteínas carboniladas no soro. A análise descritiva das variáveis será apresentada em frequência, números absolutos e medidas de tendência central e dispersão após o teste de KolmogorovSmirnov para testar a normalidade de distribuição de variáveis. A avaliação da capacidade preditiva dos índices de estresse oxidativo em relação a enxaqueca será realizada por análise de curva ROC, determinando o valor preditivo positivo e negativo. As associações entre os marcadores avaliados e estratificação clínica dos pacientes, será determinada através do coeficiente de correlação linear de Pearson, utilizando o software Stata 13.1”.

Objetivo da Pesquisa:

Segundo formulário online: Objetivo primário: “Categorizar os pacientes portadores da doença de Huntington da cidade de Ervália quanto ao grau de progressão da doença e associar a progressão com o perfil de estresse oxidativo”. Objetivos secundários: “Acessar pacientes portadores da doença de Huntington para convite e solicitações éticas como esclarecimento da pesquisa e aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE. (APENDICE 1) e se necessário, o termo de assentimento livre e esclarecido – TALE. (APENDICE 2); Aplicar a escala de avaliação da capacidade funcional total (TFC), da – UHDRS -Unified Huntingtons Disease Rating Scale (Escala unificada para avaliação da doença de Huntigton), (ANEXO 1) para categorização dos diferentes estágios da doença; Obter o soro dos pacientes para análise da atividade das enzimas antioxidantes e dos marcadores oxidativos; nalisar a estatística dos dados obtidos no questionário/escala com os resultados laboratoriais para estabelecimento de correlações”.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo formulário online: Riscos: “ os riscos que existem para a realização da pesquisa são o constrangimento dos portadores da doença ao serem avaliados pelo pesquisador ao aplicar a escala de avaliação da capacidade funcional total (TFC) da (UHDRS). A coleta da amostra de 10 ml de sangue, pode gerar dor ou hematoma no local da punção, para minimizar qualquer possibilidade de intercorrência, o procedimento será realizado por um profissional treinado e com todos os cuidados de higiene e assepsia, em caso de resistência ou desconforto do pesquisado, o procedimento será interrompido imediatamente”. Benefícios: segundo o pesquisador dentre os benefícios se encontram que a “pesquisa contribuirá para a possibilidade de encontrar caminhos que norteiem a chance de trabalhos científicos mais avançados, ao menos conseguirem retardar a progressão dessa doença, que não possui cura, e que em estado mais avançado torna-se tão agressiva”. Com relação os benefícios, estes não atendem as exigências contidas na Resolução CEP 466/12.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nesta pesquisa que se enquadra como pertencente à área Grande Área 4. Ciências da Saúde propõe-se um estudo que tem como objetivo categorizar os pacientes portadores da doença de Huntington da cidade de Ervália quanto ao grau de progressão da doença e associar a progressão com o perfil de estresse oxidativo. Trata-se de um estudo transversal e experimental, o que se justifica pelo fato de compararmos, através da análise sanguínea, o estresse oxidativo de pacientes com doença de Huntington, em diferentes estágios de progressão da doença, na cidade de Ervália MG. Na cidade de Ervália MG, alguns casos de doença de Huntington já foram diagnosticados. Para essa pesquisa, todas as pessoas já diagnosticadas serão abordadas e convidadas a participar da pesquisa e a partir daí, serão pesquisados todos os pacientes que aceitarem participar do estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador apresenta os seguintes termos: - Folha de rosto devidamente assinada e carimbada pela chefia do Departamento de Medicina e Enfermagem da UFV - Projeto de pesquisa - Formulário online - Termo de Assentimento - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Questionário – Orçamento da pesquisa – Cronograma. Autorização da Secretaria Municipal de Saúde de Ervália.

Recomendações:

Quando da coleta de dados, o TCLE deve ser elaborado em duas vias, rubricado em todas as suas páginas e assinado, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa ou responsável legal,

bem como pelo pesquisador responsável, ou pessoa(s) por ele delegada(s), devendo todas as assinaturas constar na mesma folha.

Não é necessário apresentar os TCLEs assinados ao CEP/UFV. Uma via deve ser mantida em arquivo pelo pesquisador e a outra é do participante da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Ao término da pesquisa é necessário apresentar, via notificação, o Relatório Final (modelo disponível no site www.cep.ufv.br). Após ser emitido o Parecer Consubstanciado de aprovação do Relatório Final, deve ser encaminhado, via notificação, o Comunicado de Término dos Estudos para encerramento de todo o protocolo na Plataforma Brasil.

Projeto aprovado autorizando o início da coleta de dados com os seres humanos a partir da data de emissão deste parecer.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1254306.pdf	20/03/2019 16:41:32		Aceito
Outros	cartarestpostaleonardo.pdf	20/03/2019 16:41:14	Rodrigo de Barros Freitas	Aceito
Brochura Pesquisa	projetoatualizadoleonardo.pdf	20/03/2019 16:40:47	Rodrigo de Barros Freitas	Aceito
Cronograma	cronogramaleonardo.pdf	20/03/2019 16:39:49	Rodrigo de Barros Freitas	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoCompleto.pdf	11/12/2018 15:10:26	Rodrigo de Barros Freitas	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	11/12/2018 15:09:21	Rodrigo de Barros Freitas	Aceito
Outros	questionario.pdf	11/12/2018 15:08:28	Rodrigo de Barros Freitas	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaoufvdem.pdf	09/11/2018 10:49:08	Rodrigo de Barros Freitas	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaodeinfraestrutura.pdf	08/11/2018 13:48:06	Rodrigo de Barros Freitas	Aceito

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tale.pdf	08/11/2018 13:47:39	Rodrigo de Barros Freitas	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	08/11/2018 13:47:30	Rodrigo de Barros Freitas	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	08/11/2018 13:47:18	Rodrigo de Barros Freitas	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

VICOSA, 15 de Abril de 2019

Assinado por:**Maria da Conceição Aparecida Pereira Zolnier
(Coordenador(a))**

8.4 ANEXO D - Termo de Assentimento Livre e Esclarecido

(Este documento é para participantes de 12 a 17 anos ou participantes legalmente incapazes).

O Sr. (a) está sendo convidado como voluntário (a) a participar da pesquisa **Avaliação do perfil oxidativo em pacientes com doença de Huntington em diferentes estágios, na cidade de Ervália-MG.**

Nesta pesquisa pretendemos, ter acesso aos pacientes com doença de Huntington na cidade de Ervália, em seguida aplicar uma escala para avaliar os diferentes estágios da doença, depois colher uma amostra de 10 ml de sangue para posterior análise laboratorial e comparar a evolução da doença com os resultados do sangue coletado. O motivo do estudo e da pesquisa são os sintomas provocados pela doença de Huntington que são muito marcantes e despertam a necessidade do estudo, por isso o interesse inicial na pesquisa. Existem estudos de doenças neurológicas associadas ao estresse oxidativo dos pacientes. Esta pesquisa tem como objetivo buscar a possibilidade de encontrar caminhos que norteiem a chance de trabalhos científicos mais avançados, ao menos conseguirem retardar a progressão dessa doença que em estado mais avançado, torna-se tão agressiva.

Para esta pesquisa serão adotados os seguintes procedimentos: Os pacientes serão analisados, através da aplicação da avaliação da capacidade funcional total (TFC), da UHDRS - Unified Huntingtons Disease Rating Scale (Escala unificada para avaliação da doença de Huntigton), e assim separar as pessoas em grupos onde os sintomas da doença sejam iniciais, médios e nos casos onde a doença está mais grave (avançada).

Serão colhidas amostras de sangue (10 ml) de pacientes para posterior análise em laboratório, essas amostras serão comparadas para vermos o perfil da análise do estresse oxidativo dos pacientes e qual as características em diferentes estágios da doença. A avaliação a ser aplicada, será de forma rápida, 30 minutos aproximadamente, e sem causar qualquer transtorno ao paciente. Os riscos que existem para a realização da pesquisa são o constrangimento dos portadores da doença ao serem avaliados pelo pesquisador ao aplicar a escala de evolução da capacidade funcional total (TFC), da (UHDRS) e ao colher a amostra de sangue, os riscos são os mesmos de uma coleta de sangue usual utilizado em laboratórios de análises clínicas, como dor ou hematoma no local da punção, para minimizar qualquer possibilidade de intercorrência, o procedimento será realizado por um profissional

treinado e com todos os cuidados de higiene e assepsia, em caso de resistência ou desconforto do pesquisado, o procedimento será interrompido imediatamente. O estudo pretende contribuir para o conhecimento dos parâmetros oxidativos e assim servir como base para o desenvolvimento de ações de conscientização do paciente e seus familiares quanto a formas de redução do próprio estresse e conseqüente melhoria da qualidade de vida dos portadores.

Para participar deste estudo, seu responsável legal deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. Você não terá nenhum custo e, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, diante de eventuais danos, identificados e comprovados, decorrentes da pesquisa, você tem assegurado o direito a ressarcimento. Você tem garantida plena liberdade de recusar-se a participar ou seu responsável legal de retirar o consentimento ou interromper sua participação, em qualquer fase da pesquisa, sem necessidade de comunicado prévio. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que você é atendido (a) pelo pesquisador. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar. Seu nome ou o material que indique sua participação não serão liberados sem a permissão de seu responsável legal.

Este termo de assentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no Departamento de Enfermagem e Medicina (DEM) da UFV e a outra será fornecida a você. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa, e depois desse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo e confidencialidade, atendendo à legislação brasileira, em especial, à Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, e utilizarão as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____,
contato _____, fui informado(a) dos objetivos da pesquisa **Avaliação do perfil oxidativo em pacientes com doença de Huntington em diferentes estágios, na cidade de Ervália-MG** de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e o meu responsável legal poderá modificar sua decisão sobre minha participação se assim o desejar. Já assinado o termo de consentimento por meu responsável legal, declaro que

concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via deste termo de assentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome do Pesquisador Responsável: Rodrigo de Barros Freitas **Endereço:** Av. PH Rolfs, s/no - Departamento de Medicina e Enfermagem (DEM) – Universidade Federal de Viçosa – Viçosa (MG)

Telefone: :(31) 3899-3991

Email: rodrigodebarrosfreitas@yahoo.com.br

Em caso de discordância ou irregularidades sob o aspecto ético desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP/UFV – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos Universidade Federal de Viçosa
Edifício Arthur Bernardes, piso inferior
Av. PH Rolfs, s/n – Campus Universitário
Cep: 36570-900 Viçosa/MG
Telefone: (31) 3899-2492
Email: cep@ufv.br www.cep.ufv.br

Viçosa, __ de _____ de 20 ____.

Assinatura do responsável

Assinatura do Participante

Assinatura do Pesquisador

8.5 ANEXO E - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O Sr (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa: **Avaliação do perfil oxidativo em pacientes com doença de Huntington em diferentes estágios, na cidade de Ervália-MG.** Nesta pesquisa pretendemos, ter acesso aos pacientes com doença de Huntington na cidade de Ervália, em seguida aplicar uma escala para avaliar os diferentes estágios da doença, depois colher o sangue (10 ml), para posterior análise laboratorial e comparar a evolução da doença com os resultados do sangue coletado. O motivo do estudo e da pesquisa são os sintomas provocados pela doença de Huntington que são muito marcantes e despertam a necessidade do estudo, por isso o interesse inicial na pesquisa. Existem estudos de doenças neurológicas associadas ao estresse oxidativo dos pacientes. Esta pesquisa tem como objetivo buscar a possibilidade de encontrar caminhos que norteiem a chance de trabalhos científicos mais avançados, para que consigam retardar a progressão dessa doença que em estado mais avançado, torna-se tão agressiva.

Para esta pesquisa será adotado os seguintes procedimentos: os pacientes serão analisados, através da aplicação da avaliação da capacidade funcional total (TFC) da UHDRS - Unified Huntingtons Disease Rating Scale (Escala unificada para avaliação da doença de Huntington), e assim separar as pessoas em grupos onde os estágios da doença sejam iniciais, médios e outro onde os sintomas da doença sejam mais graves (avançados). Serão colhidas amostras de 10 ml de sangue dos pacientes, por profissional treinado e em local adequado, para posterior análise em laboratório, essas amostras serão comparadas para vermos o perfil da análise do estresse oxidativo dos pacientes e qual as características em diferentes estágios da doença.

A avaliação a ser aplicada, será de forma rápida, aproximadamente 30 minutos e sem causar qualquer transtorno ao paciente. Os riscos que existem para a realização da pesquisa são o constrangimento dos portadores da doença ao serem avaliados pelo pesquisador ao aplicar a escala de avaliação da capacidade funcional total (TFC), da (UHDRS) e ao colher a amostra de sangue, os riscos são os mesmos de uma coleta de sangue usual utilizado em laboratórios de análises clínicas, como desconforto e hematomas no local da punção, para minimizar qualquer possibilidade de intercorrência, o procedimento será realizado por um profissional treinado e com todos os cuidados de higiene e assepsia, em caso de resistência ou desconforto do pesquisado, o procedimento será interrompido imediatamente. O estudo

pretende contribuir para o conhecimento dos parâmetros oxidativos e assim servir como base para o desenvolvimento de ações de conscientização do paciente e seus familiares quanto a formas de redução do próprio estresse e conseqüente melhoria da qualidade de vida dos portadores.

Para participar deste estudo o Sr (a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, diante de eventuais danos, identificados e comprovados, decorrentes da pesquisa, o Sr. (a) tem assegurado o direito a ressarcimento. O Sr (a) tem garantida plena liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem necessidade de comunicado prévio. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr (a) é atendido(a) pelo pesquisador. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. O(A) Sr.(a) não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar. Seu nome ou o material que indique sua participação não serão liberados sem a sua permissão.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no Departamento de Enfermagem e Medicina (DEM) da UFV e a outra será fornecida ao Sr.(a). Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa, e depois desse tempo serão destruídos.

Os pesquisadores terão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo e confidencialidade, atendendo à legislação brasileira, em especial, à Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, e utilizarão as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____,

contato _____, fui informado(a) dos objetivos da pesquisa **Avaliação do perfil oxidativo em pacientes com doença de Huntington em diferentes estágios, na cidade de Ervália-MG**, de maneira clara e detalhada, e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer minhas dúvidas.

Nome do Pesquisador Responsável: Rodrigo de Barros Freitas **Endereço:** Av. PH Rolfs, s/no
- Departamento de Medicina e Enfermagem (DEM) – Universidade Federal de Viçosa – Viçosa
(MG)

Telefone:(31) 3899-3991

Email: rodrigodebarrosfreitas@yahoo.com.br

Em caso de discordância ou irregularidades sob o aspecto ético desta pesquisa, você
poderá consultar:

CEP/UFV – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Universidade Federal de Viçosa

Edifício Arthur Bernardes, piso inferior
Av. PH Rolfs, s/n – Campus Universitário Cep:
36570-900 Viçosa/MG

Telefone: (31) 3899-2492

Email: cep@ufv.br www.cep.ufv.br

Viçosa, __ de _____ de 20 ____.

Assinatura do Participante

Assinatura do Pesquisador