



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Douglas Nathan Censi

**EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA FORMAÇÃO DE
AGREGADOS DE HUNTINGTINA ESTRIATAL NO MODELO ANIMAL YAC128
DA DOENÇA DE HUNTINGTON**

Florianópolis

2023

Douglas Nathan Censi

**EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA FORMAÇÃO DE
AGREGADOS DE HUNTINGTINA ESTRIATAL NO MODELO ANIMAL YAC128
DA DOENÇA DE HUNTINGTON**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia de Souza Brocardo
Coorientadora: Msc. Evelini Plácido

Florianópolis

2023

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marlene e Sérgio, que nunca mediram esforços para realizar todos os meus sonhos e me proporcionar a melhor formação possível. Mãe, obrigada por me colocar como prioridade na sua vida, por ser uma guerreira tão forte e determinada, por nunca me negar um colo, e por me guiar através dos melhores caminhos com os melhores conselhos. Pai, obrigada por ser a pessoa gentil e doce que conheço, por oferecer ternura e momentos de leveza, por me preencher com inspiração com suas histórias de vida. Só estou aqui pelo amor que vocês sentem por mim. Obrigado.

À minha irmã mais velha, Camila, que foi uma peça fundamental para eu estar onde estou hoje. Minha profunda gratidão, por todos os ensinamentos e aprendizados que só uma irmã mais velha pode proporcionar, por todos os cuidados e conselhos, por todas as brigas e risadas, por todo apoio e por sempre fazer questão de me motivar para chegar onde eu quero um dia chegar, você é um molde de exemplo a se seguir. Obrigado.

Aos meus amigos Maria Cláudia, João Vitor, Larissa, Bianca, Gabriela e Samuel, que foram minha família quando a minha estava distante, que viveram e serviram de apoio durante todos esses anos de Universidade, a vida hoje não teria sentido sem vocês. Palavras não conseguem resumir tudo que sinto, todo o amor e gratidão que tenho dentro de mim por vocês, amei viver cada momento da UFSC graças à vocês. Anseio agora pelos próximos passos em nossa caminhada da vida, que possamos estar sempre presentes um na vida do outro de alguma forma.

Ao meu companheiro André Felipe, que mesmo estando a pouco tempo na minha vida foi um pilar muito importante, que me ajudou, me deu forças e me motivou nesta reta final da graduação, com todo seu carinho, amor, compreensão e apoio.

À minha orientadora, Patricia de Souza Brocardo, por ter me dado a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa LANEP, que me acolheu de braços abertos, e em conjunto com minha coorientadora e mentora de laboratório, Evelini Plácido, me proporcionaram aprendizados e vivências que levarei para toda vida. Agradeço por suas lições, pela dedicação e incentivos, pela paciência e confiança, e por suas maneiras didáticas, profissionais e educadas de ensinar, que me ajudaram a me tornar um profissional melhor. Aos demais colegas de laboratório: Patrícia M., Thayza, Pedro, Alêcia, Maria e Amanda, agradeço pela parceria, pelo apoio, pela disposição de debater uma ideia ou ajudar com um problema, pelas risadas, e pelos momentos e perrengues compartilhados entre a gente.

Um muito obrigado em especial para a Universidade Federal de Santa Catarina, por mudar o rumo da minha vida, abrindo diversas portas que eu não acreditava que podiam ser abertas, por ter me trazido pessoas que hoje são minha família, e por fim, por me proporcionar um ensino público, gratuito e de qualidade!

RESUMO

A doença de Huntington (DH) é considerada a doença de poliglutaminas mais prevalente, sendo herdada de forma genética e afetando indivíduos de ambos os sexos e diversas raças e grupos étnicos. Seus sintomas, que são caracterizados classicamente por uma tríade sintomatológica motora, cognitiva e psiquiátrica geralmente surgem gradualmente e entre os 30 e 50 anos, embora possa ocorrer em crianças e idosos. A neurodegeneração na doença ocorre por meio de vários mecanismos, afetando principalmente regiões do estriado, que ainda não foram completamente elucidados na literatura. Um dos mecanismos significativos é a formação de agregados proteicos e seu possível papel na neurodegeneração da doença. Atualmente, não há cura ou tratamento eficaz para a DH. No entanto, em muitos casos, as pessoas conseguem manter sua independência por vários anos após o início dos sintomas, com o auxílio de medicamentos como a tetrabenazina, deutetabenazina e inibidores seletivos de recaptção de serotonina (IRSS). Porém, à medida que a doença progride, a qualidade de vida do paciente diminui gradualmente até o óbito. Dado que a cura ainda está distante, é essencial desenvolver métodos que possam retardar o desenvolvimento e a manifestação dos sintomas. Uma abordagem promissora que pode ser explorada é o ambiente enriquecido (AE), que já foi relatado na literatura como benéfico em vários aspectos da saúde. No presente estudo, avaliamos o impacto de 39 dias de exposição ao AE na agregação proteica da huntingtina, utilizando modelo animal YAC128 com 2 meses de idade através da imuno-histoquímica para EM48. Os resultados encontrados demonstraram que o AE não causou uma diferença significativa no número de agregados estriatais de htt em camundongos YAC128 durante a fase pré-motora, e também não causou efeito significativo na densidade celular estriatal. Além disso, não houve correlação significativa entre o número de agregados de htt e a densidade celular. Para uma melhor interpretação dos achados deste trabalho, são necessários estudos futuros de avaliação comportamental e morfológica para verificar se o aumento dos agregados de htt é ou não benéfico na prevenção dos sintomas. Bem como também, estudos que explorem os efeitos de diferentes estímulos presentes no AE em animais de diferentes idades, a fim de compreender melhor seus efeitos.

Palavras-chave: Doença de Huntington; Estriado; Neurodegeneração; Camundongo YAC128; Ambiente Enriquecido.

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is considered the most prevalent polyglutamine disease, inherited genetically and affecting individuals of both sexes, races, and ethnic groups. Its symptoms, classically characterized by a motor, cognitive, and psychiatric symptomatology triad, usually emerge gradually between 30 and 50 years old, although it can occur in children and the elderly. Neurodegeneration in the disease occurs through various mechanisms, mainly affecting regions of the striatum, which have not been fully elucidated in the literature. One of the significant mechanisms is the formation of protein aggregates and their possible role in the disease's neurodegeneration. Currently, there is no cure or effective treatment for HD. However, in many cases, people can maintain their independence for several years after the onset of symptoms with the help of medications such as tetrabenazine, deutetabenazine, and selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). However, as the disease progresses, the patient's quality of life gradually declines until death. Given that a cure is still distant, it is essential to develop methods that can delay the development and manifestation of symptoms. One promising approach that can be explored is the enriched environment (EE), which has been reported in the literature as beneficial in various aspects of health. In this study, we evaluated the impact of 39 days of exposure to EE on huntingtin protein aggregation using the YAC128 animal model at 2 months of age through immunohistochemistry for EM48. The results showed that EE did not cause a significant difference in the number of striatal htt aggregates in YAC128 mice during the pre-motor phase, and it also did not significantly affect striatal cell density. Furthermore, there was no significant correlation between the number of htt aggregates and cell density. For a better interpretation of this work's findings, future behavioral and morphological evaluation studies are necessary to verify whether the increase in htt aggregates is beneficial in symptom prevention. Additionally, studies exploring the effects of different stimuli present in EE in animals of different ages are needed to understand their effects better.

Keywords: Huntington's disease; Striatum; Neurodegeneration; Mouse YAC128; Environment Enrichment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplificação da mutação genética que leva a DH	11
Figura 2 - Encéfalo humano representando as partes mais afetadas pela DH.	12
Figura 3 - Modelo de patogênese celular na doença de Huntington.	16
Figura 4 - Comparação da neurodegeneração do estriado na DH	18
Figura 5 - Principais projeções estriatais envolvidas no controle motor e afetadas na DH.	19
Figura 6 - Linha temporal dos animais YAC128 da DH	21
Figura 7 - Efeitos do ambiente enriquecido no sistema nervoso central	22
Figura 8 - Protocolo de divisão dos animais utilizados para o presente estudo	25
Figura 9 - Imagem representativa do gel de genotipagem dos camundongos YAC128	27
Figura 10 - Exemplos de AE utilizados neste trabalho	28
Figura 11 - Desenho experimental.	28
Figura 12 - Imagens de um corte de encéfalo de YAC128 marcado com fluorescência demonstrando a área do estriado.	31
Figura 13 - Imunofluorescência de EM48 mostrando agregação da proteína Htt e densidade celular marcada com DAPI no estriado de camundongos e YAC128..	32
Figura 14 - Análise de células EM48+	33
Figura 15 - Análise da densidade celular marcada com DAPI.	34
Figura 16 - Correlação das células positivas para DAPI com os agregados proteicos marcados com EM48 no animais YAC128 em AC e AE.	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DH - Doença de Huntington

HTT - Gene huntingtina

Htt - Proteína huntingtina

mHtt - Proteína huntingtina mutante

AE - Ambiente enriquecido

AC - Ambiente controle

CAG - Citosina-Adenina-Guanina (glutamina)

BDNF - Fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês, Brain Derived Neurotrophic Factor)

MSN's - Neurônios espinhosos médios (do inglês, Medium spiny neurons)

GPe - Globo pálido externo

GPi - Globo pálido interno

NST - Núcleo subtalâmico

SNC - Sistema Nervoso Central

ABH - Associação Brasil Huntington

BAC - Cromossomo artificial de bactéria (do inglês, Bacterial artificial chromossome)

YAC - Cromossomo artificial de levedura (do inglês, Yeast artificial chromossome)

PBS - Solução tampão fosfato (do inglês, Phosphate Buffered Saline)

PCR - Reação em cadeia da polimerase (do inglês Polymerase chain reaction)

LAMEB - Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia

UPS - Sistema ubiquitina-proteassoma

SUS - Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 A DOENÇA DE HUNTINGTON.....	10
1.2 SINAIS E SINTOMAS CLÍNICOS DA DH.....	12
1.3 HUNTINGTINA E A NEUROPATOLOGIA DA DH.....	15
1.3.1 Neurodegeneração estriatal.....	17
1.4 MODELOS ANIMAIS NA DOENÇA DE HUNTINGTON.....	19
1.4.1 Camundongos YAC128.....	20
1.5 AMBIENTE ENRIQUECIDO.....	21
2 JUSTIFICATIVA.....	23
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 OBJETIVO GERAL.....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 ANIMAIS.....	25
4.2 GENOTIPAGEM.....	25
4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	27
4.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	29
4.4.1 Imuno-histoquímica.....	29
4.5 QUANTIFICAÇÃO.....	30
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
5 RESULTADOS.....	31
5.1 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA EM48.....	32
5.2 AVALIAÇÃO DOS AGREGADOS PROTEICOS.....	33
5.3 EFEITO DO AE SOBRE A DENSIDADE CELULAR ESTRIATAL.....	34
5.4 CORRELAÇÃO ENTRE A DENSIDADE CELULAR E AGREGADOS DE HUNTINGTINA.....	35
6 DISCUSSÃO.....	36
7 CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41

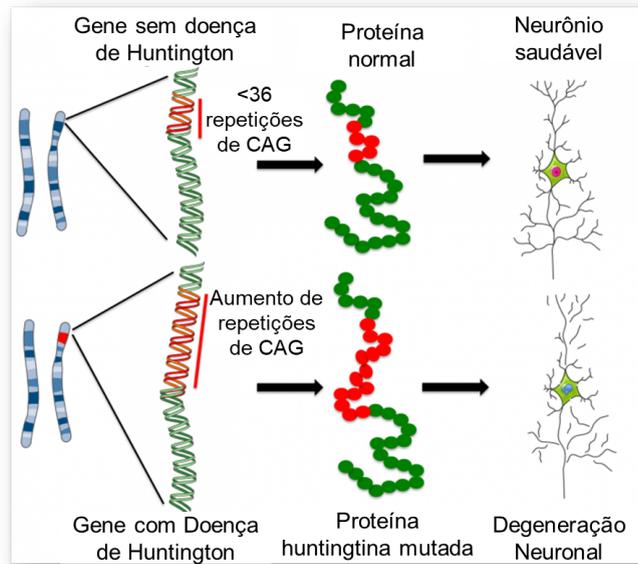
1 INTRODUÇÃO

1.1 A DOENÇA DE HUNTINGTON

As doenças genéticas são caracterizadas por modificações na sequência de nucleotídeos que afetam um segmento específico do DNA, nomeadamente os genes, induzindo conseqüentemente alterações na estrutura das proteínas. Os genes representam segmentos cruciais de DNA que facilitam a síntese precisa de proteínas, ao mesmo tempo em que determinam várias características fenotípicas. Portanto, qualquer erro ou comprometimento de um único gene pode atuar como um catalisador para a manifestação de um distúrbio genético (BROSSE, *et al.*, 1999).

A doença de Huntington (DH) é uma doença neurodegenerativa de herança autossômica dominante causada por uma expansão de repetições de trinucleotídeos citosina, adenina e guanina (CAG), codificadores do aminoácido glutamina, na porção 5' do gene huntingtina (HTT), localizado no cromossomo 4p16.3. Essa expansão leva à síntese de uma proteína huntingtina mutada (mHtt) que contém repetições de poliglutamina (poli-Q) no terminal amínico da proteína huntingtina (Htt) anormalmente alongada (HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP, 1993) (Figura 1). A DH é a doença de poli-Q mais comum entre as existentes e é caracterizada por alterações progressivas causando distúrbios motores, psiquiátricos e cognitivos, com demência e morte neuronal (GIL & REGO, 2008; BATES *et al.*, 2015). Apesar da mHtt ser expressa durante toda a vida do portador da mutação, normalmente o início dos sintomas se tornam aparentes entre as idades de 35 e 55 anos (INTERNATIONAL HUNTINGTON ASSOCIATION, 2022).

Figura 1 - Exemplificação da mutação genética que leva a DH

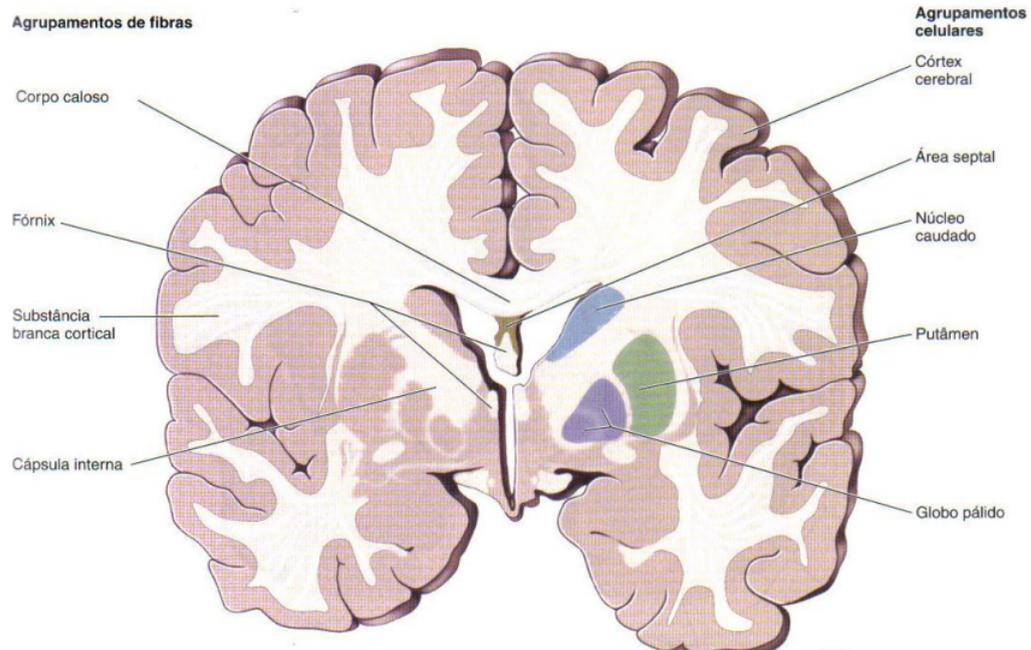


Fonte: adaptado de EuroStemCell

<https://www.eurostemcell.org/sites/default/files/inline-images/14836434032_90bc26f42e_o.png>, 2023.

A DH causa neurodegeneração gradual das células cerebrais, particularmente em neurônios do corpo estriado, mas também ocorrendo e em outras regiões encefálicas como o córtex cerebral, hipocampo e hipotálamo (VONSATTEL; DIFIGLIA, 1998; WALDVOGEL et al., 2014; LÉBOUC *et al* 2020) (Figura 2). A doença progride ao longo do tempo, tornando-se fatal entre 15 a 20 anos após o aparecimento dos primeiros sintomas (GIL & REGO, 2008). Dados epidemiológicos mostram que a DH é mais presente na população ocidental e afeta cerca de 3,60 a 7,33 indivíduos por 100.000 habitantes, enquanto que nos países de origem asiática a prevalência é de 0,40 a cada 100.000 habitantes (RAWLINS *et al.*, 2016). Especificamente no Brasil, não existem estatísticas oficiais quanto ao número de casos de DH, em um estudo realizado na região sul do país revelou uma prevalência de 1,85 indivíduos por 100.000 habitantes (CASTILHOS *et al.*, 2019).

Figura 2 - Encéfalo humano representando as partes mais afetadas pela DH.



Legenda Corte coronal do encéfalo, destacando em cores azul verde e roxa os componentes do corpo estriado, principal região afetada pela DH.

Fonte: adaptado de FRANK H. NETTER, MD - Netter Atlas de Anatomia Humana Editora Elsevier.

1.2 SINAIS E SINTOMAS CLÍNICOS DA DH

A sintomatologia clínica da DH possui uma variabilidade que é interindividual, mas geralmente é definida por uma tríade de sintomas motores, cognitivos e psiquiátricos, potencialmente causados pela disfunção e morte celular neuronal geradas pela doença (ROSS & TABRIZI, 2011). A DH pode ocasionar também distúrbios periféricos, que incluem perda de peso, e disfunção do sistema nervoso autônomo (AJITKUMAR; JESUS, 2021). Recentemente, com estudos sobre o eixo cérebro-intestino, também foram encontradas alterações na microbiota intestinal em pacientes com a DH (DU *et al.*, 2021; RHUTIK S PATIL *et al.*, 2021).

Os sintomas motores podem ser divididos em movimentos coreicos como distúrbios da marcha progressivos, que tendem a aparecer precocemente no curso da doença e deficiências motoras, como bradicinesia e rigidez, observadas em pacientes em estágio avançado da DH. Com relação aos sintomas cognitivos podem ser detectados até uma década antes do diagnóstico motor e o declínio progride à medida que a doença progride. Os déficits incluem lentidão cognitiva e diminuição da atenção e da flexibilidade mental. Já nos sintomas psiquiátricos, que também são observados precocemente nos pacientes com DH, é observado que os mesmos são frequentemente deprimidos e apresentam sinais de apatia, irritabilidade,

impulsividade, ansiedade e desinibição social (ROSS *et al.*, 2014; SAUDOU; HUMBERT, 2016; MARTINEZ-HORTA *et al.*, 2016).

Os critérios utilizados para o diagnóstico são obtidos através de um conjunto de elementos, como o histórico familiar detalhado, exames de neuroimagem, observação clínica do déficit motor progressivo associado à coreia ou rigidez, bem como alterações psiquiátricas com demência progressiva, sem causa definida (ROSS e TABRIZI, 2011). A partir da presença destes sintomas, é realizado o teste genético, de forma a avaliar a presença da mutação associada à DH, identificando o número das repetições de CAG para confirmar o diagnóstico (GIL-MOHAPEL & REGO, 2011; CARIMAN & SESTI, 2022).

Tratando-se de uma doença de herança genética que até o momento não existe cura, o tratamento para a DH atual baseia-se em amenizar os sintomas em busca da melhora na qualidade de vida dos pacientes, sendo feita uma abordagem multidisciplinar envolvendo médicos, enfermeiros, fisioterapeutas, fonoaudiólogos, nutricionistas, assistentes sociais, entre outros profissionais de saúde e aliados (INTERNATIONAL HUNTINGTON ASSOCIATION, 2022). Para o controle terapêutico da coreia, o principal distúrbio motor da doença, existem atualmente dois medicamentos aprovados pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA). O primeiro é a tetrabenazina, aprovada em 2008, sendo este, o primeiro medicamento aprovado para uso na DH nos Estados Unidos. Seu uso é eficaz para o controle dos movimentos coreicos, porém seus efeitos adversos podem impactar negativamente o seu uso, gerando possíveis distúrbios de sono, aumento dos riscos de depressão, pensamentos e comportamentos suicidas, ansiedade e agitação (FDA, 2008). Em 2017 foi aprovada a comercialização da deutetabenazina, uma versão modificada da tetrabenazina que contém moléculas de deutério, resultando em uma meia-vida prolongada no sistema, podendo a administração ser feita em doses mais baixas e menos frequentes em comparação com a tetrabenazina (HUNTINGTON STUDY GROUP *et al.*, 2016), com menor variabilidade do metabolismo e uma possível diminuição dos efeitos colaterais (RODRIGUES *et al.*, 2017). Atuam como inibidores seletivos da recaptação da monoamina vesicular tipo 2 (VMAT2), diminuindo a recaptação e o armazenamento de neurotransmissores, como dopamina, norepinefrina e serotonina, nas terminações nervosas pré-sinápticas. Essa diminuição da disponibilidade de neurotransmissores, especialmente dopamina, contribui para o controle dos sintomas motores em condições como a DH (FDA, 2017), entretanto, a depleção de serotonina e norepinefrina possivelmente é o fator responsável pela piora dos sintomas de depressão e ansiedade que já acompanham a DH (WYANT; RIDDER; DAYALU, 2017).

O tratamento para os sintomas psiquiátricos na DH incluem intervenções não farmacológicas, como terapia cognitivo-comportamental ou terapia psicodinâmica, mas essas abordagens podem ser limitadas no contexto do comprometimento cognitivo. Como abordagens farmacológicas podem ser utilizados inibidores seletivos da recaptção de serotonina (IRSS) (citalopram, fluoxetina, paroxetina e sertralina) e mirtazepina e venlafaxina, que possuem efeitos serotoninérgicos e noradrenérgicos (MCCOLGAN e TABRIZI, 2017).

Com relação à acessibilidade relacionada ao tratamento e diagnóstico da Doença de Huntington (DH), observa-se no contexto brasileiro a atuação voluntária da Associação Brasil Huntington (ABH). Essa organização presta apoio e orientação às famílias afetadas pela DH, defendendo seus interesses e divulgando informações, com o objetivo de promover a melhoria da qualidade de vida dos pacientes e seus familiares, sem fins econômicos (ASSOCIAÇÃO BRASIL HUNTINGTON, 2023).

Entretanto, a falta de dados públicos epidemiológicos sobre a DH pode gerar dificuldades no diagnóstico, no planejamento de profissionais para um acompanhamento multidisciplinar do paciente e na distribuição de medicamentos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Em 30 de janeiro de 2014, foi instituída a Portaria 199/204, estabelecendo a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras no âmbito do SUS. Essa medida abriu caminho para incentivos financeiros de custeio e, conseqüentemente, para o diagnóstico da DH (CEDARO *et al.*, 2020). No que tange ao serviço de aconselhamento genético, constatou-se que 73,8% das famílias afetadas pela doença não tiveram acesso a esse serviço, enquanto 26,2% obtiveram. Quanto ao tratamento dos sintomas da DH, 57,7% das pessoas recorrem à rede particular de saúde e 42,3% ao SUS. Anteriormente, o Brasil carecia de políticas ou programas voltados especificamente para essa população, porém, espera-se que ações efetivas direcionadas a essa temática avancem no país. Isso pode incluir a descentralização e a expansão dos centros de referência em doenças raras, como a DH, visando uma maior cobertura e melhor assistência aos pacientes e suas famílias. A busca por soluções e o apoio de instituições como a ABH são fundamentais para o avanço no tratamento e cuidado dos indivíduos com Doença de Huntington no Brasil (CARIMAN & SESTI, 2022).

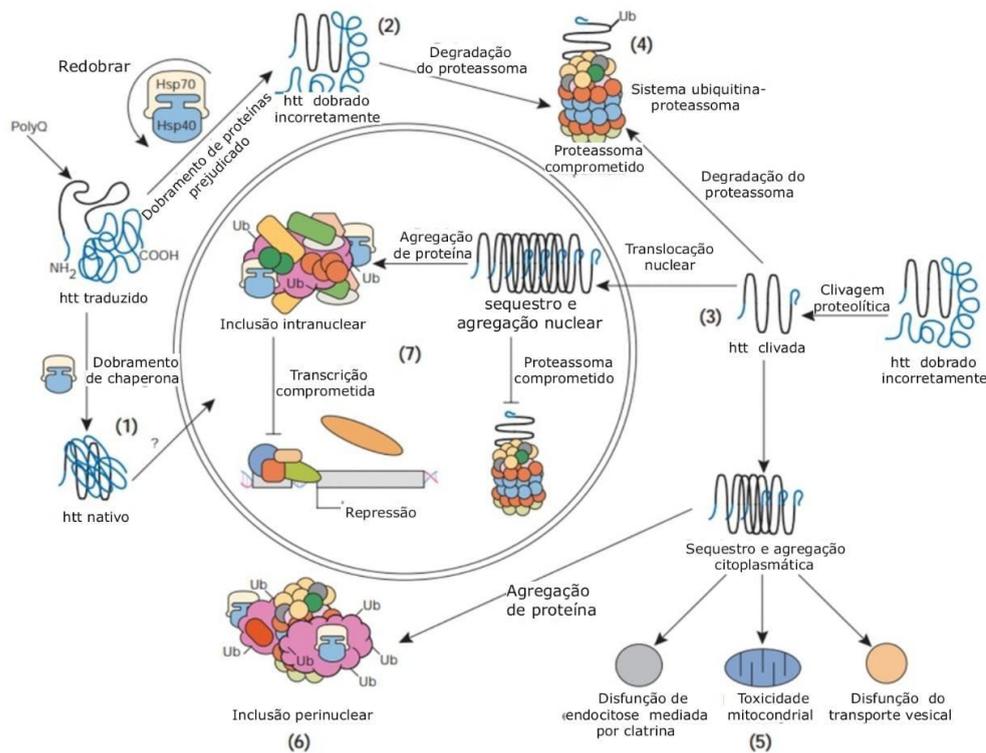
1.3 HUNTINGTINA E A NEUROLOGIA DA DH

Na Htt existe um segmento poli-Q de comprimento variável perto de seu terminal aminico. O comprimento da repetição do trinucleotídeo CAG que codifica este segmento pode ser determinado em qualquer indivíduo, é classificado como normal, em risco ou clinicamente diagnosticado com DH, através da técnica de reação de amplificação em cadeia da polimerase (PCR do inglês, polimerase chain reaction), com primers de oligonucleotídeos flanqueadores específicos (HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP, 1993). A repetição é polimórfica na população normal e fica em torno de 6 a 35 unidades. Se for uma expansão de 40 unidades ou mais, a mutação é altamente penetrante, o que desencadeia um processo de doença que inevitavelmente leva ao aparecimento de sinais motores diagnósticos da doença. Repetições de 36 a 39 unidades CAG demonstram uma penetrância diminuída, onde alguns indivíduos desenvolvem a DH, enquanto outros passam a vida sendo assintomáticos (BATES *et al.*, 2015).

A mHtt causa disfunção e morte neuronal através de vários possíveis mecanismos, que ainda não estão completamente elucidados. Um deles é relacionado aos efeitos diretos dos fragmentos N-terminais de poli-Q anormais a partir da clivagem da mHt. A mHtt tem propensão para formar agregados anormais e efeitos na proteostase celular, transporte axonal, desregulação da transcrição, tradução, disfunção sináptica e atividade anti-apoptótica (ROSS & TABRIZI, 2011; BATES *et al.*, 2015; AJITKUMAR; JESUS, 2021). Na DH também existe a presença de inclusões neuronais intranucleares que formam-se antes do início clínico da doença e tendem a aumentar durante seu curso. Esses agregados são o resultado do acúmulo de agregados proteicos anormais advindos da clivagem de mHtt e posteriormente ubiquitinação e transporte para o núcleo (DIFIGLIA *et al.*, 1997; BENN *et al.*, 2010). Estas inclusões podem ser um dos fatores desencadeadores de lesão e morte neuronal na DH, devido a alteração no funcionamento neuronal (BARSOTTINI; FERRAZ, 2005), visto que, várias proteínas interagem de forma anormal com a mHtt e são recrutadas para os agregados proteicos, causando a desregulação transcricional de importantes vias intracelulares (GIL-MOHAPEL & REGO, 2011; MCCOLGAN e TABRIZI, 2017). Em contraponto, outros estudos demonstram que as inclusões de mHtt podem apenas representar outros mecanismos secundários da disfunção celular, podendo até mesmo exercer um mecanismo protetor da forma tóxica da proteína durante as fases iniciais da doença (SAUDOU *et al.*, 1998; ARRASATE & FINKBEINER, 2012), através do sequestro de fragmentos e oligômeros tóxicos de mHtt (GIL-MOHAPEL & REGO, 2011).

Além destes, outros mecanismos que estão envolvidos com a morte neuronal na DH são o prejuízo na autofagia, na função do proteassoma e na disfunção mitocondrial (figura 3), que leva ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio e ao aumento da apoptose por ativação de determinadas vias apoptóticas que podem contribuir para esta patologia (CAVISTON & HOLZBAUR, 2009; GIL-MOHAPEL & REGO, 2011; FIELDS *et al*, 2021).

Figura 3 - Modelo de patogênese celular na doença de Huntington.



Legenda: A htt pode ser transportada para o núcleo e ter um papel na regulação transcricional (1). As chaperonas facilitam o reconhecimento de proteínas anormais, promovendo seu redobramento ou ubiquitinação (Ub) e subsequente degradação pelo proteassoma. A mutação induz mudanças conformacionais e provavelmente causa o dobramento anormal da htt, o que, se não corrigido pelas chaperonas, leva ao acúmulo de htt mal dobrada no citoplasma (2). Alternativamente, a htt mutante também pode ser clivada proteoliticamente, dando origem a fragmentos amino-terminais que formam estruturas de folha- β (3). A toxicidade pode ser desencadeada pela htt mutante de comprimento total ou pelos fragmentos amino-terminais clivados, que podem formar monômeros solúveis, oligômeros ou agregados insolúveis grandes. No citoplasma, as formas mutantes de htt podem prejudicar o sistema ubiquitina-proteassoma (UPS), levando ao acúmulo de mais proteínas mal dobradas (4). Essas proteínas tóxicas também podem prejudicar o transporte normal de vesículas e a endocitose. Além disso, a presença de htt mutante pode ativar proteínas pró-apoptóticas diretamente ou indiretamente por danos mitocondriais, levando a uma maior toxicidade celular e outros efeitos deletérios (5). Em um esforço para se proteger, a célula acumula fragmentos tóxicos em agregados perinucleares citoplasmáticos ubiquitinados (6). Além disso, a htt mutante pode ser translocada para o núcleo para formar inclusões nucleares, o que pode interferir na transcrição e no UPS (7).

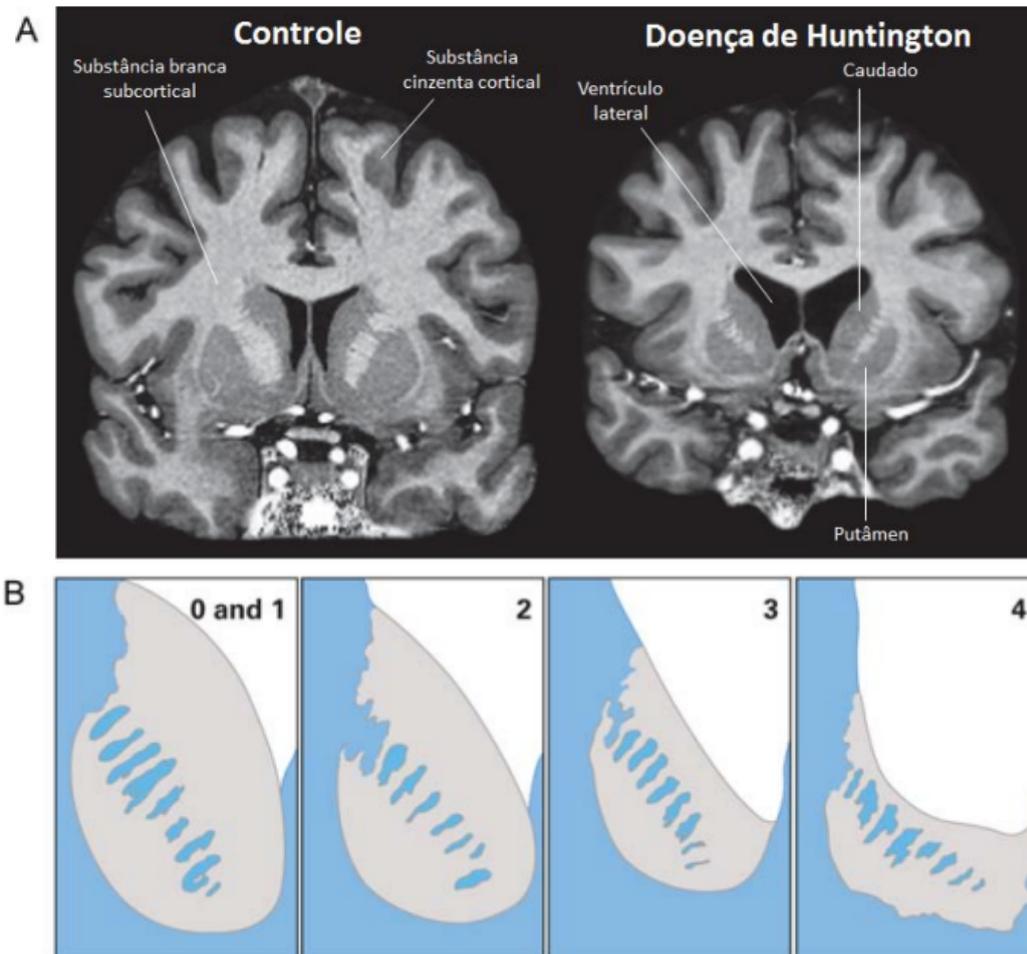
Fonte: adaptado de LANDLES & BATES, 2004.

1.3.1 Neurodegeneração estriatal

O estriado é uma das principais estruturas dos núcleos da base e é composto por três principais estruturas: o núcleo caudado, o putâmen e o globo pálido, como já demonstrado anteriormente na figura 2. Possui envolvimento em várias funções motoras, cognitivas e emocionais, sendo uma das funções mais importantes do corpo estriado a regulação do movimento voluntário. Ele desempenha um papel crítico na coordenação dos movimentos e na iniciação, supressão e ajuste fino da atividade motora (LEBOUC *et al* 2020). O estriado é composto majoritariamente pelos neurônios espinhosos médios (MSNs, do inglês, *Medium spiny neurons*), chegando a ser 95% de sua composição, além também de interneurônios, compondo os outros 5% da população neuronal estriatal (REINER & DENG, 2018).

A Htt tem como uma de suas funções conhecidas e mais importantes o papel de transporte vesicular de substâncias, entre elas a neurotrofina BDNF, a qual é encontrada em níveis diminuídos no encéfalo de pacientes e em modelos animais para DH (FERRER *et al.*, 2000; ZUCCATO; CATTANEO, 2009; PLÁCIDO *et al.*, 2021). O BDNF possui suma importância na manutenção e sobrevivência de algumas células específicas do sistema nervoso central (SNC), especialmente neurônios do estriado (ZUCCATO *et al.*, 2007) (Figura 4).

Figura 4 - Comparação da neurodegeneração do estriado na DH

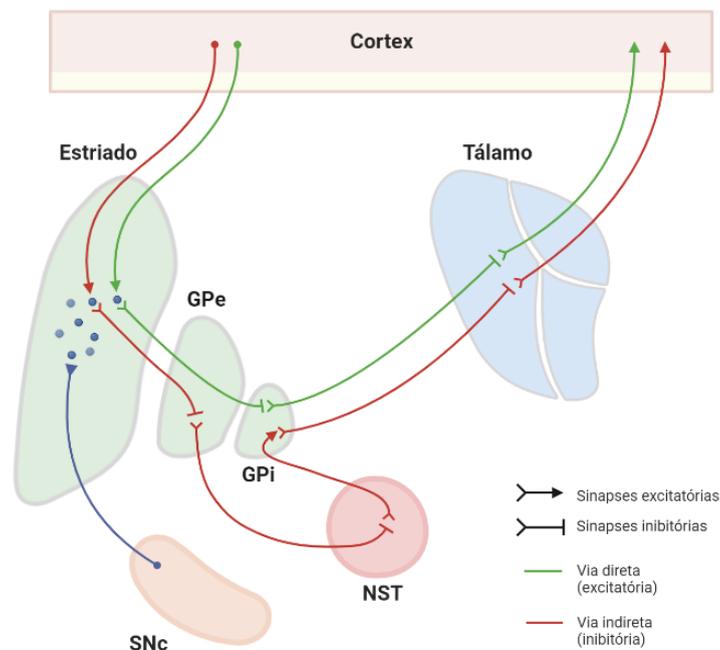


Legenda: (A) Imagem de Ressonância Magnética (RM), mostrando em um corte coronal do encéfalo de um indivíduo saudável (controle) com um indivíduo afetado com DH, com redução significativa do estriado (caudado e putâmen) e alargamento dos ventrículos laterais. Fonte: Adaptado de BATES, 2015. (B) O esquema representa o esquema dos graus da neurodegeneração estriatal, de acordo com a escala de graus de Vonsattel. No grau 0, observa-se macroscopicamente um cérebro indistinguível de cérebros normais, porém já ocorreu uma perda neuronal de 30 a 40% no corpo estriado. A progressão da neuropatologia ocorre do grau 1 ao grau 4, com atrofia progressiva e perda neuronal. No grau 4, registra-se uma perda neuronal de até 95% no corpo estriado. Fonte: adaptado de Ellison & Love (2004).

Os neurônios espinhosos médios do estriado são seletivamente vulneráveis aos efeitos da mHtt, o que desencadeia a neurodegeneração estriatal. Essa neurodegeneração ocorre em um curso de duas fases distintas. Inicialmente, há a perda de MSNs da via indireta (inibitória), resultando em um fenótipo de sintoma hipercinético. Esses MSNs projetam-se para o globo pálido externo (GPe), núcleo subtalâmico (NST), globo pálido interno (GPi), tálamo e córtex. Essa via, composta por neurônios inibitórios GABAérgicos, exerce um papel na inibição de movimentos indesejados, prevenindo a hipercinesia. Posteriormente, ocorre a perda de MSNs da via direta (excitatória), levando a um fenótipo de sintoma hipocinético. A

via direta projeta-se diretamente para o GPi, tálamo e córtex, facilitando movimentos desejados e evitando a hipocinesia. A neurodegeneração estriatal associada ao mHTT afeta seletivamente os MSNs, resultando em uma alteração sequencial nas vias indireta e direta do estriado. Essa disfunção compromete o equilíbrio entre os mecanismos inibitórios e excitatórios, o que contribui para os sintomas hipercinéticos e hipocinéticos observados na DH (LEVINE *et al.*, 2014; MCCOLGAN e TABRIZI, 2017) (Figura 5). Um dos motivos que fazem com que o estriado seja mais suscetível à degeneração é a redução da expressão de fatores tróficos na região, devido ao comprometimento deste transporte de vesículas contendo neurotrofinas na direção córtex-estriado, em especial o BDNF (GAUTHIER *et al.*, 2004).

Figura 5 - Principais projeções estriatais envolvidas no controle motor e afetadas na DH.



Legenda: Na via direta, que desempenha papel excitatório, os MSNs recebem aferências dos neurônios piramidais corticais e se projetam para o GPi e a SNr. Já na via indireta, com função inibitória, os MSNs recebem aferências dos neurônios piramidais corticais e se projetam para o GPe. O GPe, através de projeções para o NST, influencia o GPi e a SNr. É possível observar também na figura que os MSNs podem ser modulados por SNc e o Tálamo. GPe: globo pálido externo; GPi: globo pálido interno; MSN: neurônios espinhosos médios; NST: núcleo subtalâmico; SNc: substância negra pars compacta; SNr: substância negra pars reticulata.

Fonte: Desenvolvido pelo autor com BioRender.com, 2023.

1.4 MODELOS ANIMAIS NA DOENÇA DE HUNTINGTON

A partir da descoberta da causa genética da DH (HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP, 1993), diversos modelos animais foram criados

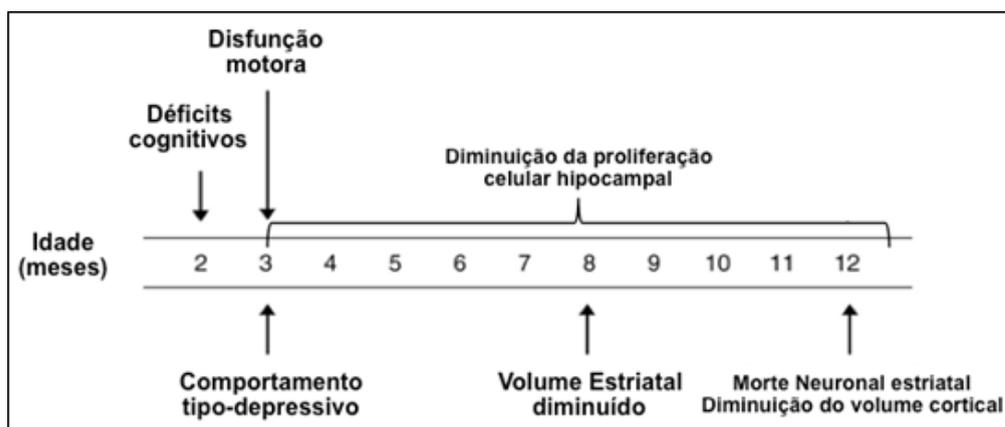
para estudar os mecanismos da doença, tendo como primeiros modelos genéticos, desenvolvido em 1996, os modelos R6/1 e R6/2, com a inserção de uma porção do gene da huntingtina mutante de um paciente com a doença (MANGIARINI *et al.*, 1996). Esses modelos apresentam sintomas motores e metabólicos, além de uma progressão rápida dos sintomas (BENN *et al.*, 2010). Devido a sua expectativa de vida curta e fenótipo de avanço acelerado da doença, foram elaborados outros modelos com características transgênicas distintas, como os modelos que expressam o comprimento total do gene HTT inserido em seus genomas, BAC (Bacterial Artificial Chromosome), através de um cromossomo artificial de bactéria, e YAC (Yeast Artificial Chromosome), por um cromossomo artificial de levedura (KIM *et al.*, 2021). Além disso, existe uma outra categoria de modelos animais chamados de Knock-in, que inclui camundongos nas quais a repetição CAG expandida é inserida diretamente no gene da Htt do camundongo, e inclui modelos como HdhQ97, HdhQ111 e HdhQ150 (WHEELER *et al.*, 2000).

1.4.1 Camundongos YAC128

Expressando o gene inteiro humano da DH com aproximadamente 128 repetições de CAG, o camundongo transgênico YAC128 apresenta uma neurodegeneração estriatal seletiva, com déficits motores e cognitivos progressivos a partir dos 3 meses de idade, além de uma sobrevivência estendida (figura 6), que faz este modelo ser considerado o de melhor representatividade da condição humana (SLOW *et al.*, 2003; EHRNHOFER *et al.*, 2009; NASCIMENTO-CASTRO *et al.*, 2022).

Exibem um padrão de comprometimento motor bifásico de atividade, com hipercinesia aos 3 meses de idade, seguido por hipocinesia detectada aos 12 meses de idade (VAN RAAMSDONK *et al.*, 2007). Apresentam também, distúrbios psiquiátricos semelhantes aos de humanos, como o comportamento tipo-depressivo e tipo-ansioso nos estágios iniciais da DH (POULADI *et al.*, 2008; WELTER, 2021, p. 97; NASCIMENTO-CASTRO *et al.*, 2022). Além disso, manifestam o aumento da huntingtina nuclear aos 12 meses de idade no estriado e já podem ser encontrados agregados proteicos de htt mutada a partir dos 2 meses de idade nesta região (VAN RAAMSDONK *et al.*, 2005). Demonstrando que, este modelo possui uma ótima possibilidade de estudo dos mecanismos implicados na fisiopatologia da doença, abrindo espaço para investigar potenciais estratégias terapêuticas que possam modificar e preservar alguns aspectos no curso da progressão da DH (VAN RAAMSDONK *et al.*, 2005; GIL-MOHAPEL *et al.*, 2011).

Figura 6 - Linha temporal dos animais YAC128 da DH.



Legenda. Figura representativa da linha temporal dos animais YAC128 demonstrando as principais alterações comportamentais e morfológicas. Fonte: adaptado de GIL-MOHAPEL et al (2011).

1.5 AMBIENTE ENRIQUECIDO

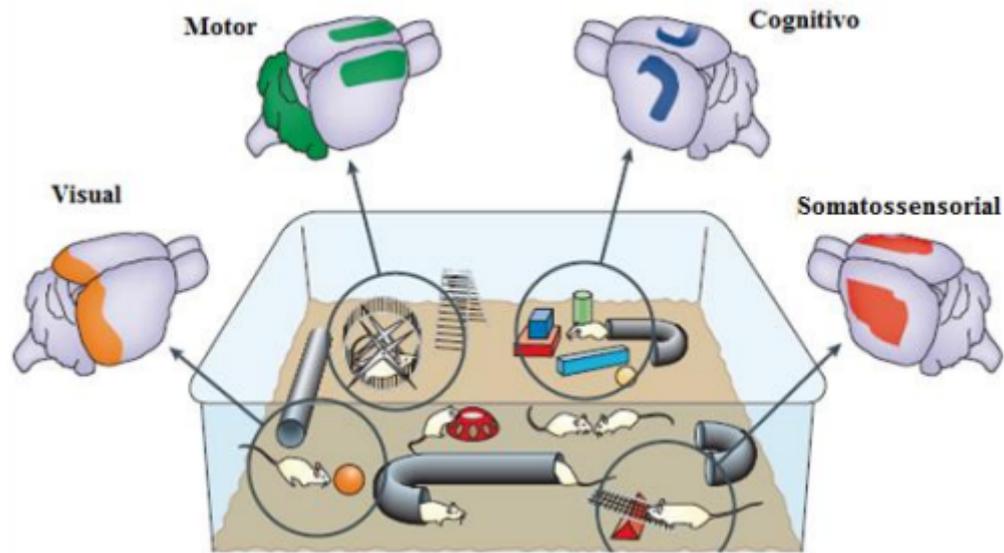
Como descrito anteriormente, sabe-se que a DH é uma doença progressiva e sua taxa de progressão varia entre pessoas, mesmo as que possuem comprimentos de repetições de CAG idênticos, o que pode sugerir que fatores ambientais podem influenciar na progressão da doença (WEXLER *et al.*, 2004).

O AE, tem por sua definição padrão ser “uma combinação de estímulos complexos de objetos inanimados e sociais que influenciam aspectos morfofuncionais cerebrais por aumentar a estimulação sensorial, cognitiva, motora e de interação social” (VAN PRAAG *et al.*, 2000), quando comparado com a condição padrão de habitação de roedores (GELFO *et al.*, 2011).

O efeito no retardo do aparecimento de sinais neurológicos em camundongos da DH, possivelmente se dá devido a um aumento da entrada sensorial e/ou atividade motora com influência direta no corpo estriado, por exemplo, alterando o número sináptico e a morfologia dos neurônios espinhosos médios (VAN DELLEN *et al.*, 2000). Já a melhora no desempenho dos roedores em testes comportamentais, como já demonstrado em trabalhos como de WELTER (2021, p. 97), podem ser, em parte, explicáveis pela descoberta de que o AE regula a expressão gênica em várias células e tecidos do encéfalo (BENN *et al.*, 2010), alterando a plasticidade cerebral (PLÁCIDO, 2018, p. 97), modificando a produção de proteínas e modulando os processos bioquímicos de, por exemplo, neurotransmissores, fatores

neurotróficos, como o BDNF, além de hormônios e fatores imunológicos (KEMPERMANN, 2019).

Figura 7 - Efeitos do ambiente enriquecido no sistema nervoso central



Legenda: Enriquecimento ambiental e os efeitos da estimulação sensorial, motora e cognitiva em diferentes áreas do encéfalo de camundongos de acordo com o tipo de estímulos e objetos. Fonte: Adaptada de Nithianantharajah e Hannan, 2006.

Embora suas formas sejam diferentes, a condição de AE em humanos pode ser executada através de um ambiente com estimulação mental, que é capaz de melhorar a capacidade de resposta aos novos desafios e funções psicossociais (SINGHAL *et al.*, 2014). Uma vez que ainda não existem tratamentos eficazes para doenças como a DH, o aumento da estimulação ambiental pode ser considerado como uma possível estratégia terapêutica para a melhora dos sintomas e o retardo da progressão dessa doença, entre outras doenças neurodegenerativas, visto que há registros na literatura de efeitos benéficos da estimulação ambiental que foram demonstrados em pacientes com DH, onde um ambiente mais estimulante demonstrou melhorar o funcionamento físico, mental e social de indivíduos (SULLIVAN *et al.*, 2001; ZINZI *et al.*, 2007), mesmo de indivíduos em estágio avançado da doença (GIL-MOHAPEL *et al.*, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

A DH é a doença mais comum entre as doenças neurodegenerativas hereditárias. Ela se manifesta em geral na vida adulta, sendo a idade de início dos sintomas parcialmente determinada pelo número das repetições CAG expandidas no gene relacionado à doença, e a outros fatores genéticos e ambientais. Ainda não há cura nem tratamento efetivo para controlar a progressão da DH. Essa falta de opções terapêuticas satisfatórias e prognóstico favorável contribui para a relutância dos possíveis portadores da mutação em realizar testes genéticos. No entanto, o momento ideal para a introdução de estratégias terapêuticas capazes de modificar o curso da DH é antes do aparecimento dos sintomas característicos da doença, como a coréia. Nessa fase, já é observada uma significativa neurodegeneração. A partir do conhecimento da causa genética da doença, foram desenvolvidos modelos para estudar a doença. Entre esses modelos, destacam-se os camundongos YAC128, que expressam o gene humano inteiro da DH e reproduzem o fenótipo apresentado por indivíduos com DH ao longo da vida. Esse modelo animal se tornou uma ferramenta valiosa para investigar o potencial de estratégias terapêuticas, como o AE. O AE consiste em proporcionar um ambiente estimulante para os animais, com atividades físicas, sociais e cognitivas, visando melhorar sua qualidade de vida e reduzir os sintomas da DH. Ao utilizar o modelo de camundongos YAC128, é possível avaliar a capacidade do AE em retardar e atenuar o conjunto de sintomas que impactam a vida dos portadores da DH. Isso inclui não apenas a coréia, mas também outros aspectos cognitivos, motores e emocionais afetados pela doença. O AE se mostra promissor como uma abordagem terapêutica potencialmente eficaz e pode fornecer valiosos potenciais para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas aos pacientes com DH.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição ao AE na neurodegeneração e agregação de htt estriatal em camundongos YAC128 .

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos da exposição ao AE:

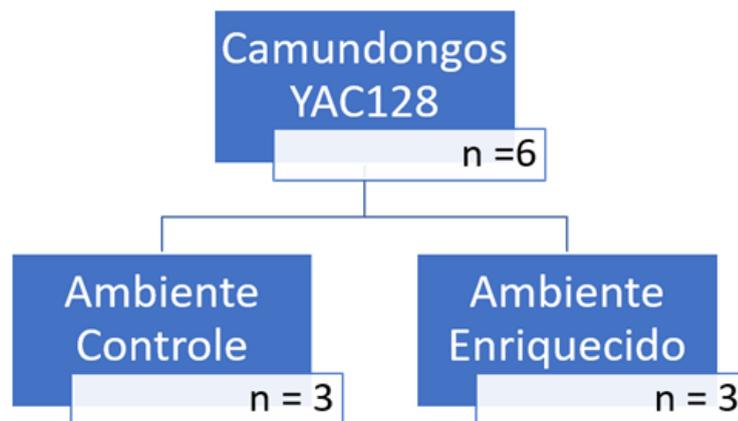
- Na formação de agregados proteicos de huntingtina mutante através de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo EM48;
- Na neurodegeneração estriatal através da avaliação da densidade de células marcadas com DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados uma pequena amostragem a partir das amostras encefálicas de camundongos transgênicos (YAC128) coletados e fixados em solução de paraformaldeído 4% pela mestra Priscilla Gomes Welter, tendo ela realizado e desenvolvido os tópicos 4.2 e 4.3. Os animais eram mantidos em condições de biotério padrão: ciclo claro/escuro padrão de 12 horas (luzes acesas às 07:00 horas) e a temperatura de 20 - 22°C com livre acesso a água e comida. As gaiolas continham no máximo seis camundongos com ambos os genótipos (YAC128 e selvagem) na mesma gaiola. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA, Florianópolis, Brasil; Número do Protocolo: 4502210318).

Figura 8 - Protocolo de divisão dos animais utilizados para o presente estudo



Legenda: Os animais foram genotipados e divididos pela então mestrandia Priscilla Gomes Welter em 2 grupos: Camundongos YAC128 AE e AC.

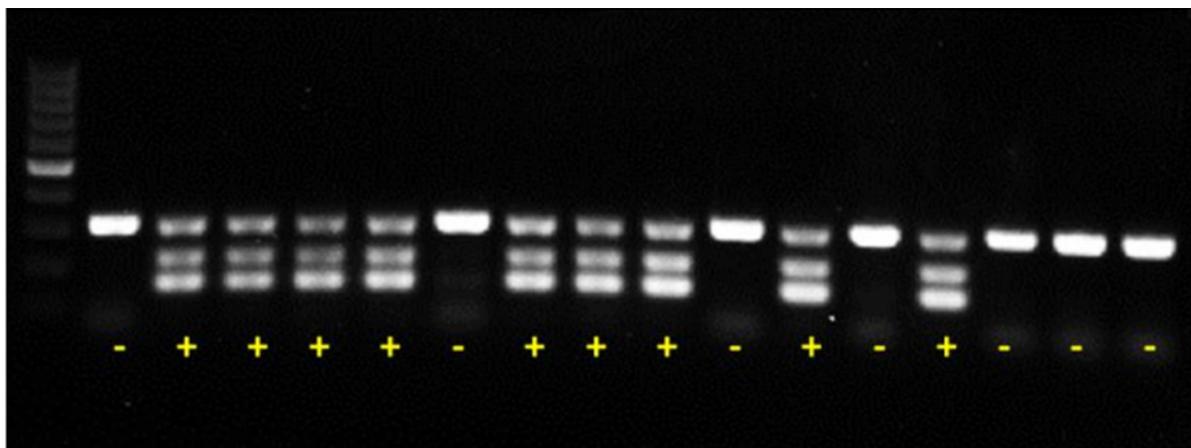
Fonte: o autor, 2023.

4.2 GENOTIPAGEM

O material genético para a realização da genotipagem foi obtido a partir de amostras de tecido da orelha. As amostras foram incubadas em 300µL de solução de lise (250µL de solução de lise nuclear, 50µL de EDTA, 2µL de proteinase K (20mg/ml) e 2µL de solução de RNase) por 3 horas a 55°C. Após a digestão, foram adicionados 100µL de solução de

precipitação proteica. Os tubos foram agitados, mantidos no gelo por aproximadamente 5 minutos e centrifugados a 14000g durante 4 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um tubo eppendorf contendo 300µL de álcool isopropílico. As amostras foram novamente centrifugadas a 14000g durante 1 minuto e, posteriormente, o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 300µL de etanol 70% e, em seguida, os tubos foram centrifugados a 14000g por 1 minuto. O álcool foi descartado e, após a secagem completa do tubo, o DNA foi reidratado com 50µL de água livre de nuclease. A PCR foi realizada em tubos de 200µL por meio da adição de mix contendo 5µL de Master Mix e 0,5µL de cada par de primers utilizados para a identificação do genótipo, que foram: LYA1= 5' CCTGCTCGCTTCGCTACTTGGAGC 3', LYA2= 5' GTCTTGCGCCTTAAACCAACTTGG 3', RYA1= 5' CTTGAGATCGGGCGTTCGACTCGC 3', RYA2= 5' CCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGC 3', e os primers utilizados como controle positivo: Actina R= 5' AGCCTCAGGGCATCGGAACC 3', Actina F= 5' GGAGACGGGGTCACCCACAC 3'. Por último, são adicionados 2 µL de cada amostra de DNA (volume final: 10 µL). As amostras foram colocadas no termociclador, utilizando um ciclo previamente padronizado para a amplificação dos fragmentos de DNA, utilizando primeiro ciclo de 3 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 63°C e 30 segundos a 72°C seguidos por 10 minutos a 72°C e a 4°C. Após a amplificação, foi realizada a eletroforese aplicando as amostras em gel de agarose 1,5% com 10,000X Syber e o resultado foi visualizado em fotodocumentador CHEMIDOC, equipamento do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) (Figura 9).

Figura 9 - Imagem representativa do gel de genotipagem dos camundongos selvagem e YAC128.



Legenda: Os símbolos (+) indicam animais positivos para a mutação (YAC128) e o (-) indicam animais negativos para a mutação (selvagens). A primeira banda representa a banda de actina (450pb), presentes em todos os animais (controle positivo). As duas bandas seguintes representam a mutação genética presente nos camundongos transgênicos, LYA (230pb) e RYA (170pb).

Fonte: Adaptado de WELTER, 2021.

4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

No dia pós-natal (DPN) 21, a então mestrandia Priscilla Gomes Welter realizou o desmame e dividiu os animais em dois ambientes: controle (AC) e enriquecido (AE). Os animais do AC foram alojados em gaiolas padrão (29 × 18 × 12 cm) e os camundongos do AE foram alojados em uma gaiola maior (39 × 32 × 16 cm) contendo quatro objetos intercalados entre tubos de plástico ou papelão, barbante ou arame encapado, toca de plástico, rede produzida a partir de máscaras cirúrgicas, algodão para nidificação, peças de lego, roda em posição horizontal sem suporte que possibilitasse a corrida (Figura 10). Esses objetos eram trocados duas vezes por semana, onde dois objetos permaneciam na caixa e dois objetos eram trocados. Os animais foram expostos por 39 dias consecutivos nos respectivos ambientes (DPN 21 até o DPN 60). Com 60 dias de vida os animais foram perfundidos e os encéfalos retirados para a avaliação da agregação proteica da DH na região estriatal dos animais (figura 11)

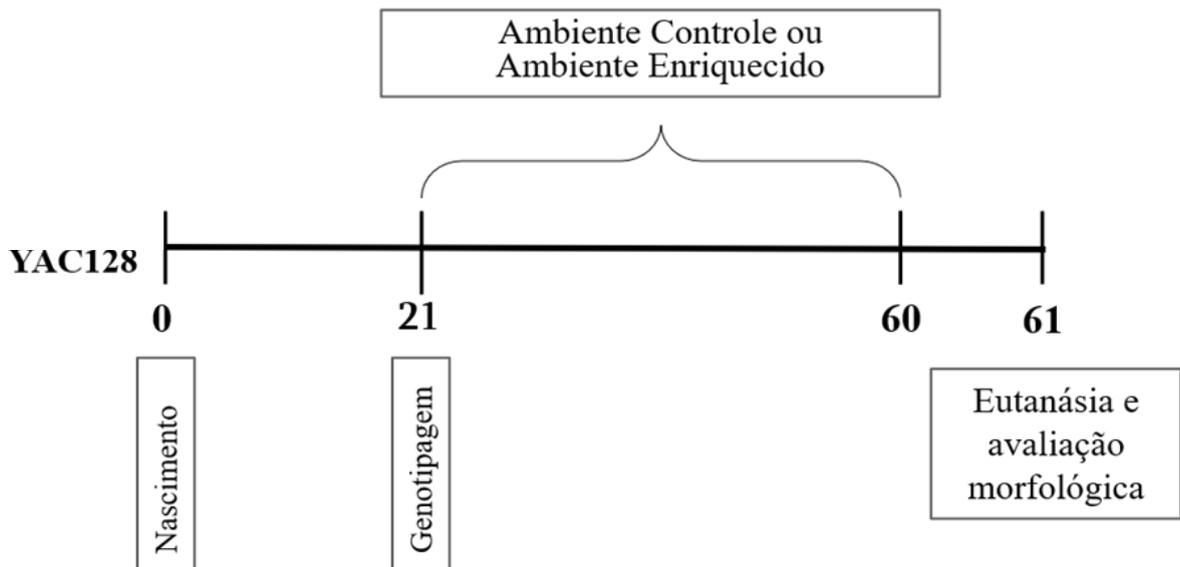
Figura 10 - Exemplos de AE utilizados neste trabalho



Legenda: Exemplos de objetos utilizados para fornecer um AE. Na imagem é possível visualizar tubos de plástico e de papelão, peças de lego, rede produzida a partir de máscara cirúrgica, toca de plástico e roda em posição horizontal.

Fonte: Adaptado de Welter, 2021

Figura 11 - Desenho experimental



Legenda: Linha de vida dos animais utilizados no experimento realizado pela então mestrande Priscilla Gomes Welter. Os animais YAC128 ficaram expostos ao AE a partir dos 21 dias de idade até completarem 60 dias de vida. AC: Ambiente controle. AE: Ambiente enriquecido.

Fonte: Autor, 2023.

4.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Após os 39 dias de exposição ao ambiente enriquecido, os animais foram anestesiados intraperitonealmente (i.p.) com quetamina (100 mg/Kg) e xilazina (8 mg/Kg) e perfundidos com solução salina 0,9%, seguida de paraformaldeído 4%. Os encéfalos foram removidos da calota craniana e ficaram por 12 horas em solução de paraformaldeído 4%, e foram colocados em solução de sacarose a 30%. Então foram realizados cortes encefálicos coronais seriados de 30 μ m de espessura utilizando o equipamento Vibratomo (Vibratome, Series 1000, St. Louis, MO, EUA). As fatias contendo o estriado foram coletadas em 1/6 séries e mantidas em solução de PBS (salina tamponada de fosfato) com azida 0,01%.

4.4.1 Imuno-histoquímica

Para determinar se a localização nuclear ou citoplasmática seletiva da htt mutante contribui para a degeneração seletiva em camundongos YAC128, realizamos a marcação de uma série coronal de seções cerebrais de YAC128 com o anticorpo EM48. Esse anticorpo foi desenvolvido contra os primeiros 256 aminoácidos do htt e apresenta alta afinidade por fragmentos do htt mutante, especialmente aqueles que estão agregados (GUTEKUNST *et al.*, 1999; KUEMMERLE *et al.*, 1999; SLOW *et al.*, 2003).

Para realizar a imuno-histoquímica com EM48, incubou-se uma série de fatias coronais contendo o estriado (Bregma 1.78 a -0,82), que então foram lavadas com solução PBS 0,1M. Após a lavagem, o tecido foi bloqueado com solução de bloqueio a 5% (soro de burro normal a 5% em PBS 0,1M com Triton X-100 a 0,25%) por 1 hora em temperatura ambiente e incubado com um anticorpo primário anti-EM48 (MAB5347, 1:200, Merck Millipore, EUA) por um período de 48 horas a 4°C. As fatias foram lavadas (PBS 0,1M e Triton X-100 a 0,25%) e bloqueadas novamente com soro de burro normal a 2% em PBS 0,1M com Triton X-100 a 0,25% por 10 minutos em temperatura ambiente, então foram incubadas com um anticorpo secundário de IgG de burro anti-rato conjugado com Alexa Flúor 568 em solução de bloqueio a 5% em temperatura ambiente por 2 horas. Ao final da preparação, foi realizada uma marcação com DAPI, um marcador de núcleo celular por 5 minutos.

4.5 QUANTIFICAÇÃO

As amostras analisadas foram separadas em 2 grupos e utilizados 3 animais por grupo correspondente ao ambiente os quais os animais faziam parte, sendo eles, YAC128 em ambiente controle (AC) e YAC128 em ambiente enriquecido (AE). As amostras foram visualizadas e quantificadas no microscópio de fluorescência BX41 fornecido pelo LAMEB. Foram analisados 4 cortes encefálicos da região do estriado, olhando para ambos os hemisférios, por animal, tanto para as inclusões proteicas quanto para as células positivas para DAPI. Na análise de inclusões foi realizado uma média da quantidade de inclusões encontradas em cada corte por animal. Para a quantificação de células positivas para DAPI foi utilizado o software Fiji (SCHINDELIN *et al.*, 2012), criado a partir do programa de código aberto ImageJ (RUEDEN, C. T., 2017).

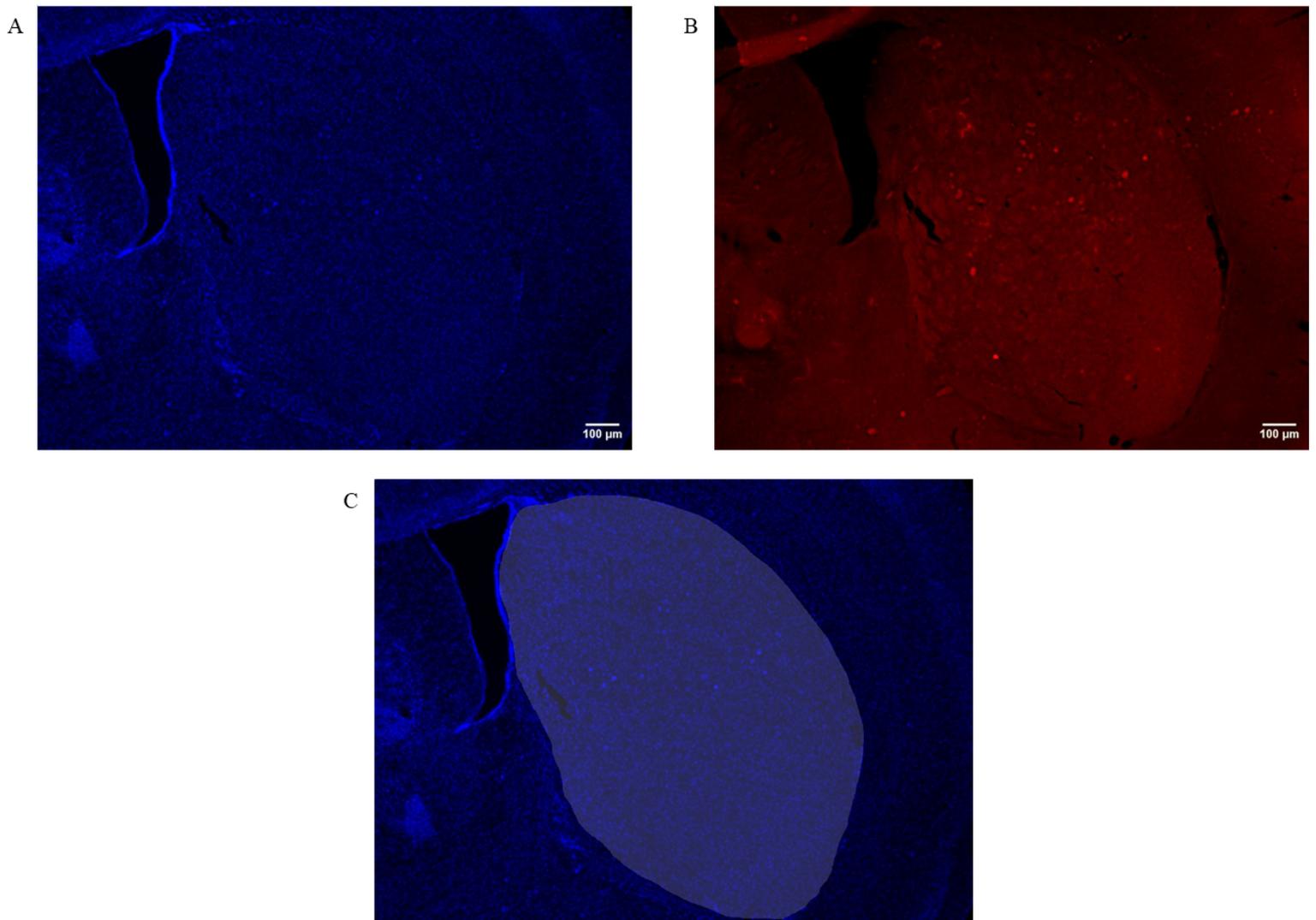
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 7 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA) e Stata/MP 14.2 (StataCorp, College Station, TX, EUA). Todos os dados foram analisados quanto à sua normalidade utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnof, e os resultados obtidos foram analisados por Teste T de Student. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), e os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$. Os gráficos foram montados utilizando o software Microsoft Excel e Stata/MP 14.2A avaliação de correlação entre os dados das células marcadas com DAPI e Células EM48+foi realizada através do teste de Correlação de Pearson (r). O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

Com o desenvolvimento do presente estudo foi investigado se a exposição a uma condição de AE gera um possível impacto na formação de agregação proteica de huntingtina, bem como, na neurodegeneração na DH, através de análises morfológicas do estriado (figura 12) a partir de protocolos desenvolvidos e aplicados no modelo animal YAC128.

Figura 12 - Imagens de um corte de encéfalo de YAC128 marcado com fluorescência demonstrando a área do estriado.

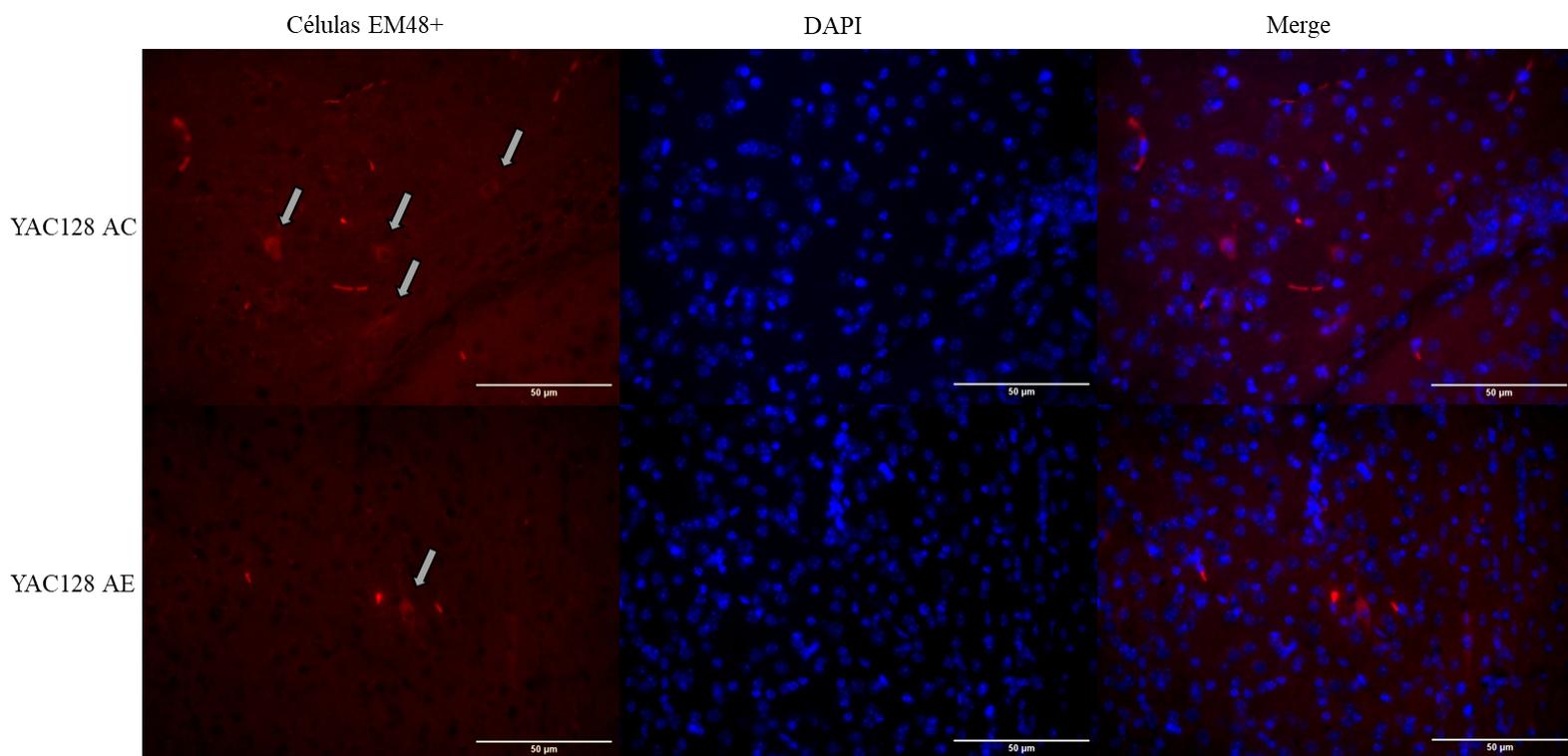


Legenda: Três imagens representativas, demonstrando a área encefálica (estriado) analisada no espectro de luz azul com DAPI (A), vermelho com EM48 (B), e uma exemplificação da área delimitada do estriado analisada no trabalho (C) em um aumento de 4x no microscópio BX41 (Barra de escala = 100μm) fornecido pelo LAMEB.
Fonte: O autor, 2023

5.1 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA EM48

A avaliação de agregados de huntingtina foi realizada através de imuno-histoquímica para o EM48, por apresentar alta afinidade por fragmentos da mHtt, e co-marcado com DAPI, um marcador de núcleo celular, para melhor análise dos agregados de Htt, as imagens representativas estão na figura 13.

Figura 13 - Imunofluorescência de EM48 mostrando agregação da proteína Htt e densidade celular marcada com DAPI no estriado de camundongos e YAC128.

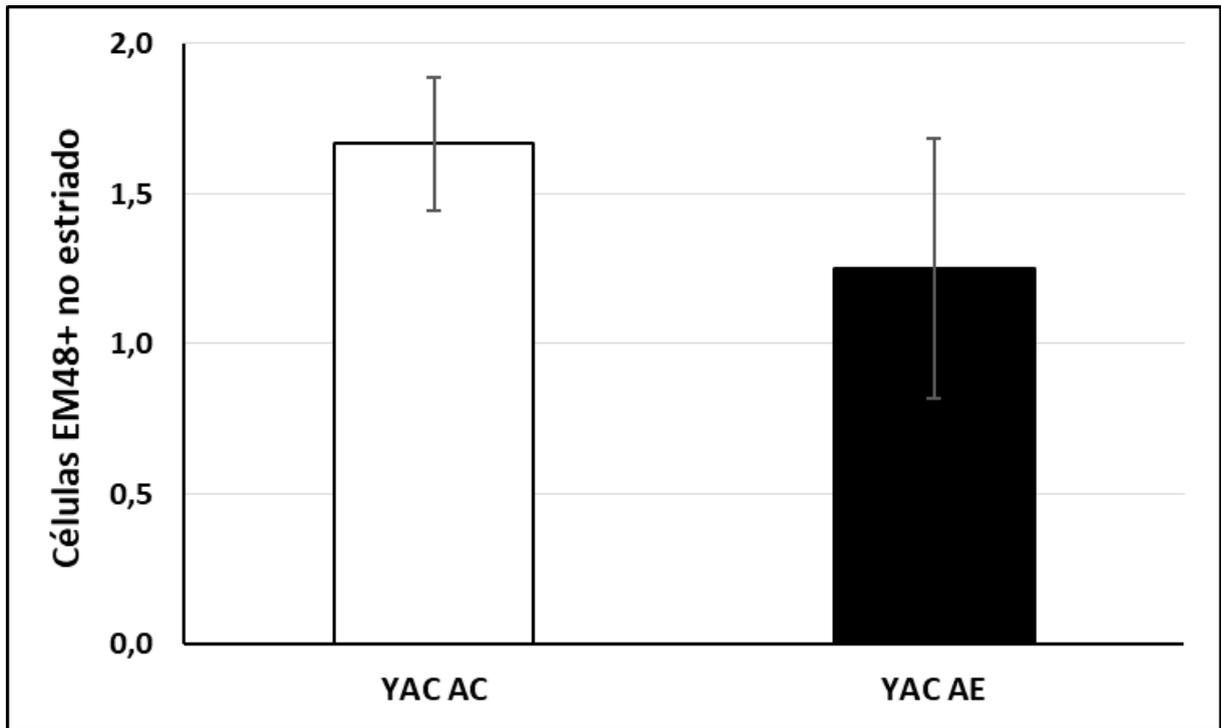


Legenda: Seções representativas do estriado processadas para imunofluorescência de EM48 e DAPI em camundongos YAC128 em AC e camundongos YAC128 no AE. As fotografias foram tiradas com uma objetiva de 40x no microscópio BX41 (Barra de escala = 50µm) fornecido pelo LAMEB. AC: ambiente controle, AE: ambiente enriquecido. Fonte: o autor, 2023.

5.2 AVALIAÇÃO DOS AGREGADOS PROTEICOS

Os agregados proteicos de htt foram avaliadas através da quantificação de EM48 ao longo do estriado em encéfalos de camundongos e YAC128 em ambiente controle e ambiente enriquecido. Foi realizado o teste T de Student, o qual revelou que não houve um efeito significativo do ambiente [$p = 0,44$] na análise.

Figura 14 - Análise de células EM48+

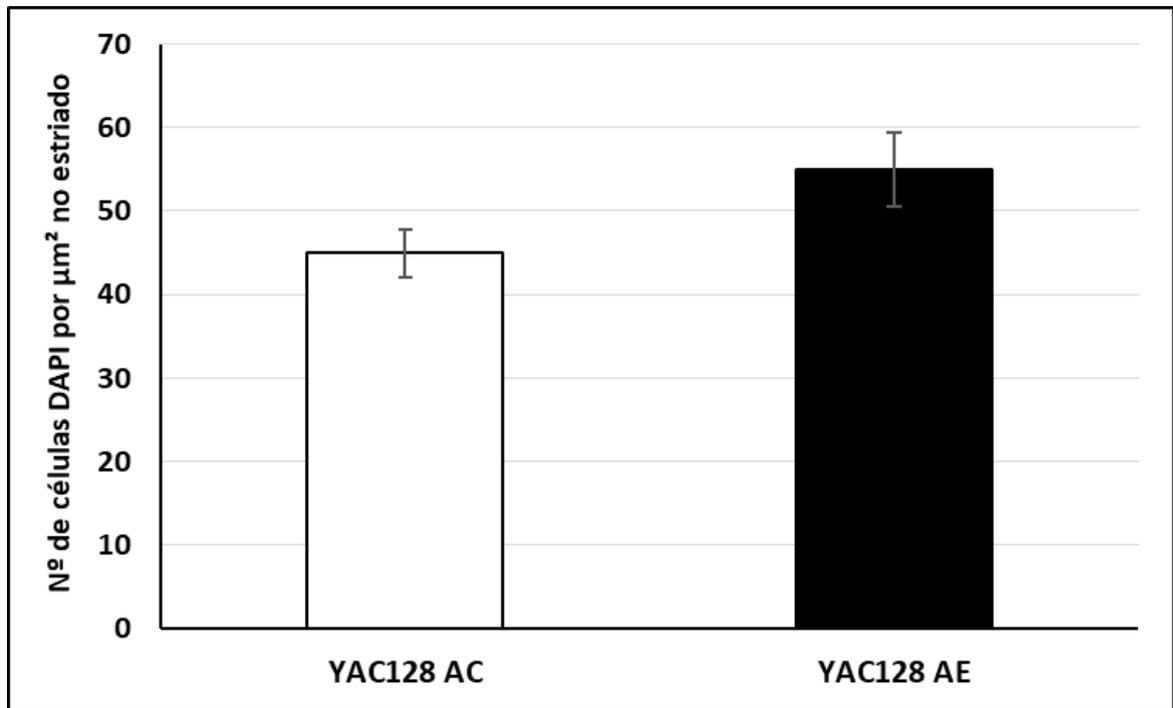


Legenda: número de agregados proteicos de htt marcados com EM48 por imuno-histoquímica encontrados no estriado de animais YAC128 expostos ao AC e ao AE.

5.3 EFEITO DO AE SOBRE A DENSIDADE CELULAR ESTRIATAL

As células marcadas com DAPI foram quantificadas ao longo do estriado em encéfalos de camundongos YAC128 (Figura 15). O teste T de Student revelou que não houve efeito significativo do ambiente no número de células marcadas [$p = 0,12$].

Figura 15 - Análise da densidade celular marcada com DAPI

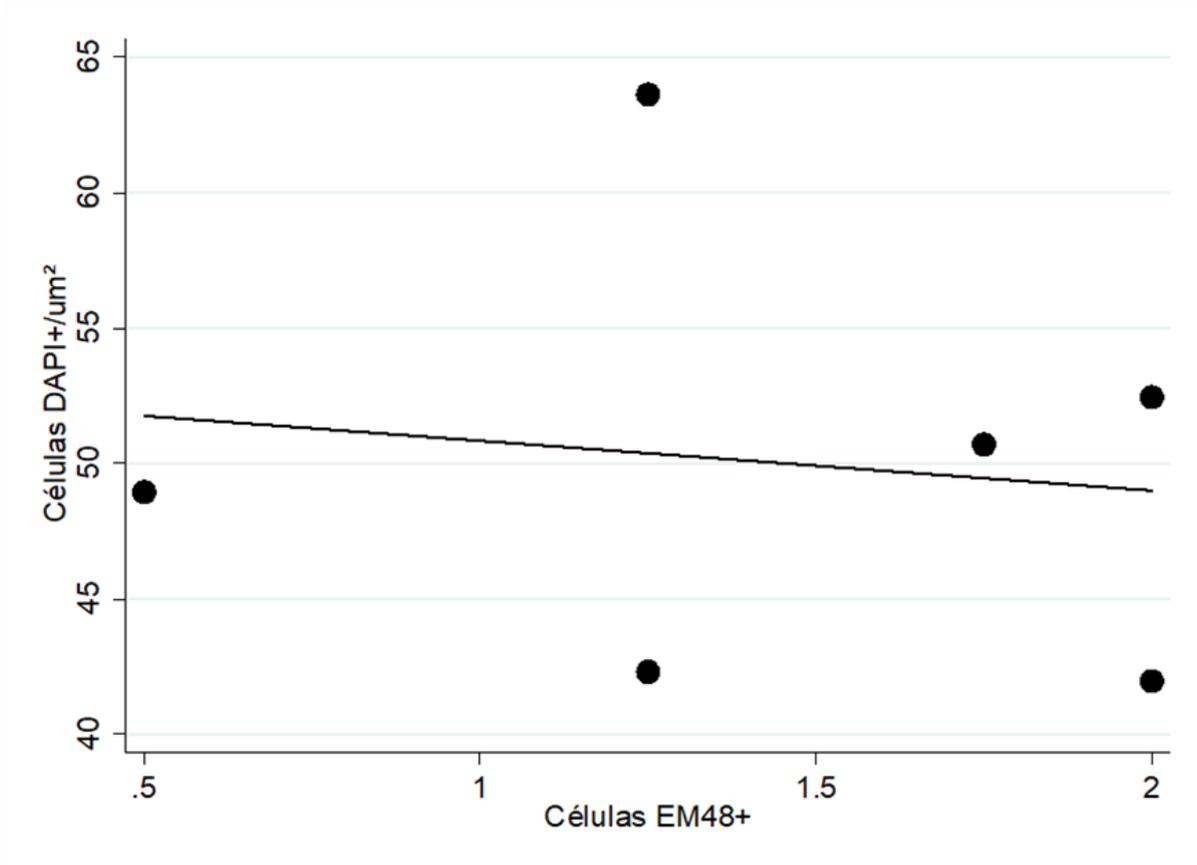


Legenda: número de células marcadas com DAPI por μm^2 encontrados no estriado de animais YAC128 expostos ao AC e ao AE.

5.4. CORRELAÇÃO ENTRE A DENSIDADE CELULAR E AGREGADOS DE HUNTINGTINA

Foi realizada uma análise de correlação entre as células marcadas com DAPI e os agregados de huntingtina. O teste de correlação de Pearson revelou que não houve correlação entre os dados ($r = -0,02$; $p = 0,94$).

Figura 16 - Correlação das células positivas para DAPI com os agregados proteicos marcados com EM48 no animais YAC128 em AC e AE.



Legenda: Correlação realizada entre o número de células por μm^2 marcadas com DAPI e os agregados proteicos marcados com EM48 encontrado no estriado de animais YAC128 expostos ao AC e ao AE.

6 DISCUSSÃO

A DH é um distúrbio neurodegenerativo de herança autossômica dominante, caracterizado por uma progressiva degeneração neuronal de início tardio, com influência da quantidade de repetições CAG e também fatores ambientais, que influenciam e interferem na progressão da doença (WEXLER *et al.*, 2004). Essa condição é causada pela expressão de formas mutantes da proteína htt, que contêm uma expansão de poliglutamina codificada por repetições CAG no exon 1 do gene da huntingtina (VONSATTEL & DIFIGLIA, 1998; GUTENKUNST *et al.*, 1999; ROSS & TABRIZI, 2011). A proteína htt em condições homeostáticas desempenha várias funções celulares vitais para a manutenção da saúde e funcionamento adequado das células e dos tecidos. Embora a função exata da htt ainda não esteja completamente elucidada pela literatura, estudos indicam que ela desempenha um papel importante na regulação de processos intracelulares, incluindo o transporte axonal, a sinalização celular, a transcrição gênica e a manutenção da homeostase celular (SAUDOU; HUMBERT, 2016; MARTINEZ-HORTA *et al.*, 2016). A htt interage com várias proteínas e está envolvida em complexas redes de interações moleculares. Um dos mecanismos importantes em que a htt está envolvida é o transporte axonal. Ela desempenha um papel crucial na regulação do tráfego de vesículas e organelas ao longo dos neurônios, contribuindo para a manutenção da integridade e função sináptica (ROSS *et al.*, 2014; SAUDOU; HUMBERT, 2016). Alterações na htt podem afetar negativamente esse processo, comprometendo a comunicação intercelular e levando à disfunção neuronal, como é no caso da DH (GIL-MOHAPEL & REGO, 2011; ROSS e TABRIZI, 2011).

Um dos aspectos característicos neuropatológicos da DH, além da neurodegeneração estriatal, é a formação de agregados proteicos de huntingtina anormais. Estes agregados proteicos de huntingtina são estruturas compostas por proteínas mal dobradas ou parcialmente desnaturadas, que se acumulam no citoplasma ou núcleo das células. Na DH, os agregados proteicos são formados devido a clivagem de mHtt, que tem sido relatada em indivíduos portadores da DH durante todo curso da doença (DAVIES *et al.*, 1997; DIFIGLIA *et al.*, 1997; BATES, 2003) e também em camundongos transgênicos incluindo o modelo YAC128 (SLOW *et al.*, 2005; VAN RAAMSDONK *et al.*, 2007). Esses agregados proteicos podem desempenhar um papel complexo na progressão da doença. É encontrado na literatura que a formação destes agregados proteicos seja um possível mecanismo de defesa celular, como uma tentativa de sequestro e inativação das formas mutantes da proteína Htt (Gutkunst *et al.*,

1999; Ross & Tabrizi, 2011) visto que muitos dos agregados nucleares no corpo estriado estão presentes em neurônios que resistem à neurodegeneração na DH (Kuemmerle *et al.*, 1998). Essas inclusões intracelulares podem ajudar a proteger as células do estresse oxidativo e de outras formas de dano celular, impedindo a disseminação de espécies reativas de oxigênio e outros compostos tóxicos (SAUDOU *et al.*, 1998; ARRASATE & FINKBEINER, 2012). No entanto, ao mesmo tempo, os agregados proteicos também podem ter efeitos tóxicos para as células (GIL-MOHAPEL & REGO, 2011).

Por ainda não possuir perspectivas de cura para a DH, uma abordagem promissora que pode ser explorada é a exposição ao AE, que já foi relatado na literatura como benéfico em vários aspectos da saúde (KEMPERMANN, 2019). Diversos modelos animais, inclusive modelos da DH, mostram efeitos positivos robustos do AE em diferentes níveis (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006). Portanto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a possível influência do AE na formação das agregações proteicas de huntingtina e na densidade celular do estriado em camundongos YAC128. Através das análises morfológicas e de quantificação microscópica a partir de protocolos realizados com base na literatura.

Para avaliar os efeitos do AE na densidade celular e na formação de agregados de huntingtina, foi utilizado um protocolo de imuno-histoquímica para marcadores endógenos de agregados proteicos de huntingtina com EM48 com co-marcação para DAPI. Neste trabalho as análises demonstraram que os camundongos YAC128 que foram expostos por 39 dias ao AE não apresentaram uma diferença significativa na quantidade de agregados de huntingtina presentes no estriado, comparando com camundongos YAC128 expostos ao AC. Os achados durante o curso deste trabalho foram de encontro com os achados de HOCKLY e colaboradores (2002), e VAN DELLEN e colaboradores (2008), que também demonstraram não haver alteração na quantidade de agregados de huntingtina nos animais expostos ao AE. Essas pesquisas utilizaram diferentes modelos animais, sendo estudo de HOCKLY e colaboradores (2002) utilizados animais da linhagem R6/2, onde estes animais foram expostos a um protocolo de AE durante um período de 62 dias, e feito do dia 28 ao dia 90 de vida dos animais, e então analisados aos 3 meses de vida. Já no estudo de VAN DELLEN e colaboradores (2008) os animais que foram utilizados no trabalho eram da linhagem R6/1 e R6/2, estes animais possuíam 5 meses e foram expostos aos seus protocolos de ambiente enriquecido a partir de 4 semanas de vida.

Em contraponto com os achados do presente trabalho, os achados de BENN e colaboradores (2010) utilizando modelos animais da linhagem R6/1 e R6/2 com idades de 12

e 24 meses expostos a um protocolo de AE por 4 semanas, obteve um resultado significativo na diminuição dos agregados de huntingtina. Já para Hodgson e colaboradores (1999) seus dados obtidos com animais da linhagem YAC48 e YAC72 aos 12 meses de idade geraram uma possível indicação de que os agregados de huntingtina podem não ser essenciais para o início da doença, pois demonstram que a neurodegeneração pode ocorrer na ausência destes agregados proteicos da doença. O que levanta a dúvida de, por não se saber ainda do papel dos agregados de huntingtina, se os mesmos possuem um mecanismo tóxico ou protetor, encontrar ou não uma diferença significativa no AE seria algo benéfico para os portadores da DH ou não? A pesquisa científica contínua é fundamental para esclarecer as possíveis discrepâncias encontradas e para avançar na compreensão do papel do ambiente enriquecido neste contexto da doença. Não foram encontrados trabalhos na literatura usando o mesmo modelo animal YAC128 em protocolo de AE analisando os agregados proteicos de huntingtina.

Realizou-se também neste trabalho uma análise da densidade celular estriatal com marcações imuno-histoquímicas com DAPI, para associar a possível neurodegeneração estriatal nos animais expostos ao AE quando comparados ao AC. Viu-se que não houve diferença estatística significativa encontrada na análise da densidade células dos animais expostos ao AE e ao AC. Ao examinar os resultados obtidos e considerando estudos prévios, notou-se que pesquisas conduzidas por VAN DELLEN e colaboradores (2000), HOCKLY e colaboradores (2002) e STEVENTON e colaboradores (2015) obtiveram dados que a exposição ao AE, quando comparado com o controle possui uma atenuação na neurodegeneração estriatal. Apenas em um destes estudos foi utilizado o mesmo modelo animais YAC128 (STEVENTON *et al.*, 2015), onde os animais foram expostos a partir das 5 semanas de vida até o período de análise que foi realizado com 20 semanas, os outros estudos foram os animais da linhagem R6/1 (VAN DELLEN *et al.*, 2000), com animais expostos ao protocolo de AE a partir de 4 semanas de vida, até sua análise em 19 a 22 semanas, e R6/2 (HOCKLY *et al.*, 2002), com 60 dias de exposição ao AE, também a partir de 4 semanas e vida até a análise dos animais com 3 meses. Essas descobertas são relevantes, pois indicam a possível influência benéfica do ambiente enriquecido na preservação da integridade neuronal no estriado. É importante destacar que, neste estudo foram analisados animais mais jovens (8 semanas) e com menor tempo de exposição ao AE (39 dias) em comparação com os protocolos utilizados nos estudos anteriores, o que pode ser uma possível indicação da diferença de resultados obtidos.

A partir dos resultados obtidos, decidiu-se realizar também uma possível correlação das células positivas para DAPI com os agregados proteicos marcados com EM48 nos animais YAC128 expostos aos diferentes ambientes, mas também não foi encontrado diferença significativa nos resultados, possivelmente devido ao número baixo de amostras utilizadas no estudo, além da idade dos animais utilizados.

Os resultados obtidos neste estudo apesar de não terem sido significativos, e não tenham trazido resultados surpreendentes, acrescentam informações ao conhecimento atual sobre a relação entre o ambiente enriquecido, a agregação de huntingtina e a densidade celular da região do estriado em modelos animais específicos (YAC128) e faixas etárias examinadas (2 meses). Essa diversidade de resultados dos estudos citados comparados a este estudo pode ser atribuída a diversos fatores, como variações nos protocolos experimentais, diferenças na idade e nos modelos animais utilizados, no número de animais utilizados e até mesmo na complexidade do próprio mecanismo patológico da DH. No entanto, novas investigações são necessárias para uma compreensão completa e abrangente desse tema complexo, visando contribuir para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas e estratégias preventivas eficazes para a DH.

7 CONCLUSÃO

A presença de agregados proteicos é uma característica histopatológica distintiva da DH, uma condição neurodegenerativa progressiva. Até o momento, o papel preciso desempenhado pela proteína Htt, responsável pela formação desses agregados, permanece em grande parte desconhecido. A complexa interação entre os agregados proteicos e a neurodegeneração tem sido objeto de uma discussão científica em curso, marcada por controvérsias relacionadas ao ganho de função e à toxicidade.

Os resultados encontrados no presente estudo demonstraram que nesta população de animais YAC128 com 2 meses, o AE não alterou significativamente a formação de agregados de htt, e também não teve efeito sobre a densidade celular, possivelmente devido às limitações do protocolo e do baixo número de amostras. Embora ainda haja um longo caminho a percorrer até a aplicação clínica dessas estratégias, o estudo do AE e de outros métodos terapêuticos em modelos animais da DH representa um avanço importante na busca por tratamentos mais efetivos e melhores perspectivas para os pacientes afetados por essa doença neurodegenerativa debilitante.

REFERÊNCIAS

- AJITKUMAR, A.; JESUS, O. DE. Huntington Disease. **Medizinische Genetik**, v. 30, n. 2, p. 246–251, 2021.
- ARRASATE, M; FINKBEINER, Steven. Protein aggregates in Huntington's disease. **Experimental neurology**, v. 238, n. 1, p. 1-11, 2012.
- BARSOTTINI, O. G. P.; HB, Ferraz. Síndromes coréicas. **Borges DR, Rothschild HA, organizadores. Atualização terapêutica. São Paulo: Artes Médicas**, p. 1083-6, 2005.
- BATES, G. P. The molecular genetics of Huntington disease — a history. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 10, p. 766–773, 31 ago. 2005.
- BENN, Caroline L. *et al.* Environmental enrichment reduces neuronal intranuclear inclusion load but has no effect on messenger RNA expression in a mouse model of Huntington disease. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 69, n. 8, p. 817-827, 2010.
- BROSS, Peter et al. Protein misfolding and degradation in genetic diseases. **Human mutation**, v. 14, n. 3, p. 186-198, 1999.
- CARIMAN, Mariana Oliveira Ramalho; SESTI, Luís Fernando Castagnino. Perfil dos portadores da Doença de Huntington no Brasil. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, p. e6511729565-e6511729565, 2022.
- CASTILHOS, Raphael Machado de et al. Minimal prevalence of Huntington's disease in the South of Brazil and instability of the expanded CAG tract during intergenerational transmissions. **Genetics and Molecular Biology**, v. 42, p. 329-336, 2019.
- CASTRO, Cristine de Paula Nascimento. Aspectos comportamentais e morfofuncionais do estriado e hipocampo no modelo animal YAC128 da doença de Huntington: investigação do efeito neuroprotetor do Probucof. 2018. 174p. Tese (Doutorado em Neurociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/211248>>. Acesso em: 29/06/2023.
- CAVISTON, Juliane P.; HOLZBAUR, Erika LF. Huntingtin as an essential integrator of intracellular vesicular trafficking. **Trends in cell biology**, v. 19, n. 4, p. 147-155, 2009.
- CEDARO, José Juliano et al. Doença neurodegenerativa rara: itinerário de portadores de doença de huntington em busca de diagnóstico e tratamento. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 5, p. 13182-13197, 2020.
- CROOK, Zachary R.; HOUSMAN, David. Huntington's disease: can mice lead the way to treatment?. **Neuron**, v. 69, n. 3, p. 423-435, 2011.
- DIFIGLIA, Marian *et al.* Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. **Science**, v. 277, n. 5334, p. 1990-1993, 1997.

DU, Gang *et al.* Altered gut microbiota related to inflammatory responses in patients with Huntington's disease. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 603594, 2021.

EHRNHOFER, Dagmar E. *et al.* Mouse models of Huntington disease: variations on a theme. **Disease models & mechanisms**, v. 2, n. 3-4, p. 123-129, 2009.

ELLISON, D. *et al.* Hyperkinetic movement disorders. **Neuropathology**, 2004.

FDA. Xenazine (tetrabenazine). **Food and Drug Administration**, p. 1–63, 2008. Disponível em <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/021894lbl.pdf>

FDA. Austedo (deutetrabenazine). **Food and Drug Administration**, p. 1–17, 2017. Disponível em <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/208082s000lbl.pdf>

FERRER, I. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor in Huntington disease. **Brain research**, v. 866, n. 1-2, p. 257-261, 2000.

FIELDS, E. *et al.* Gene targeting techniques for Huntington's disease. **Ageing Research Reviews**, v. 70, p. 101385, 2021.

GAUTHIER, Laurent R. *et al.* Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. **Cell**, v. 118, n. 1, p. 127-138, 2004.

GIL, Joana M.; REGO, Ana Cristina. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 2803-2820, 2008.

GIL-MOHAPPEL, Joana *et al.* Neurogenesis in Huntington's disease: can studying adult neurogenesis lead to the development of new therapeutic strategies?. **Brain research**, v. 1406, p. 84-105, 2011.

MOHAPPEL, Joana M. Gil; REGO, Ana Cristina. Doença de Huntington: uma revisão dos aspectos fisiopatológicos. **Revista Neurociências**, v. 19, n. 4, p. 724-734, 2011.

MACDONALD, Marcy E. *et al.* A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. **Cell**, v. 72, n. 6, p. 971-983, 1993.

GUTEKUNST, Claire-Anne *et al.* Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 7, p. 2522-2534, 1999.

HICKEY, Miriam A.; CHESSELET, Marie-Françoise. Apoptosis in Huntington's disease. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 27, n. 2, p. 255-265, 2003.

HOCKLY, Emma *et al.* Environmental enrichment slows disease progression in R6/2 Huntington's disease mice. **Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society**, v. 51, n. 2, p. 235-242, 2002.

HODGSON, J. Graeme *et al.* A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. **Neuron**, v. 23, n. 1, p. 181-192, 1999.

HUNTINGTON, George; CHOREA, MD On. **The Medical and Surgical Reporter: A Weekly Journal** 26. 1872.

International Huntington Association. **Huntington's Disease**. [S. l.], [202-]. Disponível em: <https://huntington-disease.org/new-to-huntingtons-disease-2/>. Acesso em: 14 nov. 2022.

KEMPERMANN, Gerd. Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 20, n. 4, p. 235-245, 2019.

KIM, Amy *et al.* New avenues for the treatment of Huntington's disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8363, 2021.

KOPITO, Ron R. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. **Trends in cell biology**, v. 10, n. 12, p. 524-530, 2000.

KUEMMERLE, Stefan *et al.* Huntingtin aggregates may not predict neuronal death in Huntington's disease. **Annals of neurology**, v. 46, n. 6, p. 842-849, 1999.

LANDLES, Christian; BATES, Gillian P. Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease: Fourth in Molecular Medicine Review Series. **EMBO reports**, v. 5, n. 10, p. 958-963, 2004.

LEBOUC, Margaux *et al.* Striatal circuit development and its alterations in Huntington's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 145, p. 105076, 2020.

MANGIARINI, Laura *et al.* Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. **Cell**, v. 87, n. 3, p. 493-506, 1996.

MARTINEZ-HORTA, Saul *et al.* Neuropsychiatric symptoms are very common in premanifest and early stage Huntington's disease. **Parkinsonism & related disorders**, v. 25, p. 58-64, 2016.

PAULA NASCIMENTO-CASTRO, Cristine *et al.* Temporal Characterization of Behavioral and Hippocampal Dysfunction in the YAC128 Mouse Model of Huntington's Disease. **Biomedicines**, v. 10, n. 6, p. 1433, 2022.

PAULSEN, Jane S. Cognitive impairment in Huntington disease: diagnosis and treatment. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 11, p. 474-483, 2011.

PETRASCH-PARWEZ, Elisabeth *et al.* Neuropathology in Huntington's Disease: A Balancing Act between Neurodegeneration and Aggregates. In: From Pathophysiology to Treatment of Huntington's Disease. **IntechOpen**, 2022.

PLÁCIDO, Evelini. EFEITOS DO AMBIENTE ENRIQUECIDO NA NEUROPLASTICIDADE HIPOCAMPAL NO MODELO ANIMAL YAC128 DA DOENÇA

DE HUNTINGTON. 2021. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Neurociências, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/190154/PGNC0285-D.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>> Acesso em: 08 jun. 2023.

PLÁCIDO, Evelini *et al.* Linking Huntington disease, brain-derived neurotrophic factor, and depressive-like behaviors. In: *The Neuroscience of Depression*. **Academic Press**, 2021. p. 161-177.

PLOTKIN, Joshua L.; SURMEIER, D. James. Corticostriatal synaptic adaptations in Huntington's disease. **Current opinion in neurobiology**, v. 33, p. 53-62, 2015.

POULADI, Mahmoud A. *et al.* Prevention of depressive behaviour in the YAC128 mouse model of Huntington disease by mutation at residue 586 of huntingtin. **Brain**, v. 132, n. 4, p. 919-932, 2009.

PRUT, Laetitia; BELZUNG, Catherine. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

RAWLINS, Michael D. *et al.* The prevalence of Huntington's disease. **Neuroepidemiology**, v. 46, n. 2, p. 144-153, 2016.

REINER, Anton; DENG, Yun-Ping. Disrupted striatal neuron inputs and outputs in Huntington's disease. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 24, n. 4, p. 250-280, 2018.

RHUTIK S PATIL *et al.* The gut microbiome in Huntington disease: A review. **GSC Biological and Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 3, p. 317-326, 2021..

RODRIGUES, Filipe B. *et al.* Tetrabenazine versus deutetrabenazine for Huntington's disease: twins or distant cousins?. **Movement disorders clinical practice**, v. 4, n. 4, p. 582-585, 2017.

ROSS, Christopher A. *et al.* Huntington disease: natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. **Nature Reviews Neurology**, v. 10, n. 4, p. 204-216, 2014.

ROSS, Christopher A.; TABRIZI, Sarah J. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. **The Lancet Neurology**, v. 10, n. 1, p. 83-98, 2011.

SANTOS, V. Doenças genéticas. *Biologia Net*. 2021. Disponível em: <<https://www.biologianet.com/doencas/doencas-geneticas.htm>>

SANTOS, João Vitor Santana *et al.* Caracterização funcional dos casos de doença de Huntington em um município brasileiro. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e54010716688-e54010716688, 2021.

SAUDOU, Frédéric *et al.* Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. **Cell**, v. 95, n. 1, p. 55-66, 1998.

SAUDOU, Frédéric; HUMBERT, Sandrine. The biology of huntingtin. **Neuron**, v. 89, n. 5, p. 910-926, 2016.

SLOW, Elizabeth J. *et al.* Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. **Human molecular genetics**, v. 12, n. 13, p. 1555-1567, 2003.

STEVENTON, Jessica J. *et al.* In vivo MRI evidence that neuropathology is attenuated by cognitive enrichment in the YAC128 Huntington's disease mouse model. **Journal of Huntington's disease**, v. 4, n. 2, p. 149-160, 2015.

VAN DELLEN, Anton *et al.* Delaying the onset of Huntington's in mice. **Nature**, v. 404, n. 6779, p. 721-722, 2000.

VAN DELLEN, Anton *et al.* Wheel running from a juvenile age delays onset of specific motor deficits but does not alter protein aggregate density in a mouse model of Huntington's disease. **BMC neuroscience**, v. 9, p. 1-12, 2008.

VAN PRAAG, Henriette; KEMPERMANN, Gerd; GAGE, Fred H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 1, n. 3, p. 191-198, 2000.

VAN RAAMSDONK, Jeremy M. *et al.* Selective degeneration and nuclear localization of mutant huntingtin in the YAC128 mouse model of Huntington disease. **Human molecular genetics**, v. 14, n. 24, p. 3823-3835, 2005.

VAN RAAMSDONK, Jeremy M.; WARBY, Simon C.; HAYDEN, Michael R. Selective degeneration in YAC mouse models of Huntington disease. **Brain research bulletin**, v. 72, n. 2-3, p. 124-131, 2007.

VONSATTEL, Jean Paul G.; DIFIGLIA, Marian. Huntington disease. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 57, n. 5, p. 369, 1998.

WELTER, Priscilla Gomes. Efeitos do ambiente enriquecido nos déficits motores, comportamentais e nos níveis de monoaminas no modelo YAC128 da Doença de Huntington. 2021. 97p. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Disponível em:

<<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/229888>>. Acesso em: 29/06/2023.

WEXLER, N. S. *et al.* Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 10, p. 3498-3503, 2004.

WHEELER, Vanessa C. *et al.* Long glutamine tracts cause nuclear localization of a novel form of huntingtin in medium spiny striatal neurons in Hdh Q92 and Hdh Q111 knock-in mice. **Human molecular genetics**, v. 9, n. 4, p. 503-513, 2000.

WYANT, Kara J.; RIDDER, Andrew J.; DAYALU, Praveen. Huntington's disease—update on treatments. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 17, p. 1-11, 2017.

ZUCCATO, Chiara; CATTANEO, Elena. Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. **Progress in neurobiology**, v. 81, n. 5-6, p. 294-330, 2007.

ZUCCATO, Chiara; CATTANEO, Elena. Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. **Nature Reviews Neurology**, v. 5, n. 6, p. 311-322, 2009.