

Victor Silva da Fonsêca

**Avaliação dos efeitos da administração intranasal do
fator neurotrófico derivado do encéfalo em um
modelo animal da doença de Huntington**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação
em Neurociências da
Universidade Federal de
Santa Catarina como requisito
para a obtenção do Título de
Mestre em Neurociências
Orientadora: Prof. Dr. Patricia
de Souza Brocardo

Florianópolis
2017

Silva da Fõnseca, Victor

Avaliação dos efeitos da administração intranasal do fator neurotrófico derivado do encéfalo em um modelo animal da doença de Huntington / Victor Silva da Fõnseca ; orientador, Patrícia de Souza Brocardo, 2017.

81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.


1. Neurociências. 2. Doença de Huntington. 3. BDNF. 4. Neuroplasticidade. 5. Hipocampo. I. Souza Brocardo, Patrícia de . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

VICTOR SILVA DA FONSÊCA

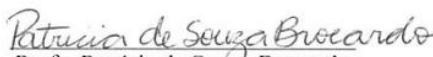
**“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO
INTRANASAL DO FATOR NEUOTRÓFICO
DERIVADO DO ENCÉFALO EM UM MODELO ANIMAL
DA DOENÇA DE HUNTINGTON”**

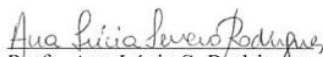
Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

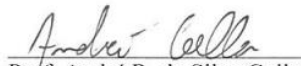
Florianópolis, 12 de maio de 2017.


Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador do Curso

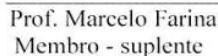
Banca Examinadora:


Profª. Patrícia de Souza Brocardo
Orientadora – UFSC


Profª. Ana Lúcia S. Rodrigues
Membro – UFSC


Prof. André R. da Silva Colla
Membro externo


Profª. Manuella Pinto Kaster
Membro – UFSC


Prof. Marcelo Farina
Membro - suplente

Dedico este trabalho a todas as
pessoas que me apoiaram na
caminhada até aqui.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha mãe, que sempre me estimulou com todo o amor, carinho e companheirismo incondicional durante todo o tempo e esteve sempre preocupada por causa da distância, mas feliz e orgulhosa de ver o crescimento profissional do filho.

Agradeço a excelentíssima professora doutora Patrícia Brocardo por aceitar me orientar, mesmo sem me conhecer e a 2000 km de distância. Não foi só uma orientadora, mas uma amiga, companheira de experimentos e madrugadas corridas de revisão de artigo. Foi uma segunda mãe para mim. Obrigado.

Agradeço a Pollyana que me acompanhou durante todos estes anos sempre (quase sempre) me apoiando e estando do meu lado.

Agradeço ao meu grupo de pesquisa, o LANEP (que tem uma farda que dá inveja para os outros laboratórios), pelo apoio mútuo que existiu entre a equipe, onde todo mundo se ajuda, supre a falta do outro e ajuda a progredir juntos. Obrigado Cristine, Kátia, Evelini, Elisa, Ana e Cláudia, vocês são todas umas queridas, obrigado pela companhia, aprendizado e momentos felizes.

Agradeço ao grande doutor André Colla, que foi meu tutor inicial com o tratamento nos YACs, na vida acadêmica e no container.

Às professoras Ana Lúcia, Joana Mohapel e Andreza de Bem pela hospitalidade e conhecimentos passados através das aulas e dos encontros nos laboratórios.

Agradeço a Davi por ter me recepcionado inicialmente na cidade de Florianópolis e por dividir o mesmo teto comigo, nos perrengues e nas alegrias por 1 ano.

Agradeço a galera que estava ali comigo, dividindo as dores de cabeça, estresses, e risadas, tanto no bar quanto no lab, Francis, Júlia, Gisa, Gianni, Aline e Maurício.

Aos alunos dos laboratórios das duas professoras pelo tempo em conjunto, me aguentando, reclamando do cheiro dos camundongos que eu estava dissecando, aguentando minhas conversas e etc.

Agradeço também a todos os meus colegas de disciplina que estavam ali na luta comigo, vendo os problemas e habilidades de cada um e contribuindo no desenvolvimento mútuo.

Agradeço ao pessoal do vôlei do Alcir por me ajudar a aumentar meus níveis de BDNF endógeno. Valeu Francis por me convidar para conhecer essa galera massa.

À CAPES por não me deixar morrer de fome (e ao RU pelo mesmo motivo).

À minha mãe, porque ela fez papel de “pãe” e por isso (e muitas outras coisas, a mulher é ligada no 220, nunca para) merece agradecimento dobrado.

RESUMO

A doença de Huntington (DH) é uma doença neurodegenerativa causada por uma expansão de repetições CAG no gene que codifica a proteína huntingtina. O estágio sintomático é definido pelo aparecimento de sintomas motores. Entretanto, sintomas psiquiátricos, incluindo humor deprimido, são características comuns da DH e podem ocorrer até uma década antes da manifestação dos sintomas motores. Os camundongos transgênicos YAC128 são um modelo da DH e apresentam comportamento tipo-depressivo e déficits cognitivos antes dos sintomas motores, similar ao que ocorre em humanos. O que nos permite estudar as alterações comportamentais emocionais sem confundir com os efeitos causados pela deficiência motora. Neste estudo os camundongos YAC128 foram utilizados para testar os efeitos do tratamento intranasal (i.n.) por 15 dias com o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) na dose de 1,66 µg/kg na prevenção dos comportamentos tipo-depressivo. Os camundongos YAC128 tratados com BDNF apresentaram uma diminuição do comportamento anedônico nos testes de preferência a sacarose e no teste de borrifagem de sacarose. Além disso, o tratamento com BDNF i.n. foi capaz de prevenir o aumento do tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda e no teste do nado forçado sem alterar a locomoção no campo aberto. Investigou-se posteriormente se o efeito do tipo-antidepressivo do BDNF estava associado com uma modulação da neurogênese hipocampal. Entretanto, o tratamento i.n. com BDNF por 15 dias aumentou a proliferação celular (Ki-67) e a diferenciação neuronal (DCX) no giro denteado (GD) hipocampal dos camundongos selvagens sem alterar estes parâmetros nos animais YAC128. Com o objetivo de verificar se as alterações comportamentais ocorreram devido a um aumento na neuroplasticidade avaliou-se a densidade dendrítica destes animais. Nossos resultados mostram que o tratamento com BDNF na dose utilizada não foi capaz de modificar a plasticidade dendrítica. Em conclusão, nossos resultados sugerem que a administração não invasiva de BDNF por via i.n. pode ter um importante potencial terapêutico para tratar sintomas tipo-depressivos em pacientes em estágios iniciais da DH sem alterar a neurogênese e a plasticidade dendrítica.

Palavras-chave: YAC128, BDNF, doença de Huntington, intranasal, depressão

ABSTRACT

Huntington disease (HD) is a neurodegenerative disorder caused by an expanded CAG repeat in the Huntington's disease gene. The symptomatic stage of the disease is defined by the onset of motor symptoms. However, psychiatric symptoms, including depressive humor, are common features of HD and can occur a decade before the manifestation of motor symptoms. The YAC128 HD transgenic mouse model develops motor deficits at a later stage, allowing more time to study the occurrence of early-stage depressive behaviors without the confounding effects of motor impairment. We used this HD mouse model to test the effects of intranasal (i.n.) brain-derived neurotrophic factor (BDNF) treatment for 15 days, with a dose of 1.66 µg/kg, in the occurrence of depressive-like behaviors during the early-stage of disease progression. The BDNF-treated YAC128 mice showed a decrease in anhedonic behavior in the sucrose preference test and in the splash test. In addition, i.n. treatment with BDNF was able to prevent the increase in the immobility time in the tail suspension test and in the forced swim test without altering the locomotion investigated in the open field test. Furthermore, we also investigated whether the antidepressant-like effects of BDNF were associated with an increase in adult hippocampal neurogenesis. However, BDNF treatment only increased cell proliferation (ki-67) and neuronal differentiation (DCX) in the hippocampal dentate gyrus (DG) of wild-type (WT) mice without altering these parameters in their YAC128 counterparts. To verify if the behavioral changes were caused by an increase in the neuroplasticity, we analyzed dendritic density in the hippocampal DG of WT and YAC128 mice treated with BDNF, using Sholl Analyses. Our results show that BDNF i.n. administration for 15 days was not able of modifying dendritic plasticity. In conclusion, our results suggest that non-invasive administration of BDNF via the i.n. route may have a therapeutic potential for the treatment of mood disorders in early symptomatic HD patients without altering neurogenesis and dendritic plasticity.

Keywords: YAC128, intranasal, BDNF, depression, Huntington Disease

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Funções principais da huntingtina.	4
Figura 2: Linha do tempo que correlaciona às mudanças comportamentais e neuropatológicas da doença de Huntington em camundongos YAC128.	9
Figura 3: Eixo nariz-encéfalo.....	13
Figura 4: Protocolo experimental.....	18
Figura 5: Exemplo do gel da genotipagem dos camundongos YAC12819	
Figura 6: Administração i.n. de BDNF realizada nos animais	20
Figura 7: Resumo da transformação da fotografia de um neurônio marcado com DCX até a figura representativa da análise de Sholl completa no programa Fiji	28
Figura 8: Avaliação do tratamento repetido com BDNF i.n. no comportamento anedônico dos camundongos YAC128 no teste de preferência a sacarose.....	31
Figura 9: Avaliação do tratamento repetido com BDNF i.n. no comportamento anedônico dos camundongos YAC128 no teste de borrifagem de sacarose.....	32
Figura 10: Avaliação do tratamento repetido com BDNF i.n. no comportamento tipo-depressivo dos camundongos YAC128 no teste de suspensão pela cauda.....	34
Figura 11: Avaliação do tratamento repetido com BDNF i.n. no comportamento tipo-depressivo dos camundongos YAC128 no teste do nado forçado.....	36
Figura 12: Avaliação do tratamento repetido com BDNF i.n. na proliferação celular hipocampal.....	39
Figura 13: Avaliação do tratamento repetido com BDNF i.n. na diferenciação neuronal	41
Figura 14: Avaliação do tratamento repetido com BDNF i.n. na arborização dendrítica dos neurônios marcados com DCX.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

CAG – Citosina-Adenina-Guanina (glutamina)

DCX - Doublecortina

DH – Doença de Huntington

E.P.M. – Erro padrão da média

GD – Giro Denteado

i.c.v. – Intracerebroventricular

i.n.- intranasal

Long term potentiation)

NGF – Fator de crescimento neural (do inglês, Neural Growth Factor)

NT-3 – Neurotrofina 3

NT-4 - Neurotrofina 4

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

PFA – Paraformaldeído

SNC – Sistema Nervoso Central

TCA – Teste do campo aberto

TBS – Tampão fosfato

TPS- Teste da preferência de sacarose

TNF – Teste do nado forçado

TST – Teste de suspensão pela cauda (do inglês, Tail Suspension Test)

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A DOENÇA DE HUNTINGTON.....	1
1.2. A PROTEÍNA HUNTINGTINA.....	3
1.3. HIPOCAMPO NA DH.....	6
1.4. MODELOS ANIMAIS DA DOENÇA DE HUNTINGTON.....	7
1.5. FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DO ENCÉFALO NA DH.....	9
1.6. O USO DA VIA INTRANASAL (I.N.) COMO ROTA DE ENTREGA DE SUBSTÂNCIAS AO SNC.....	11
1.6.1. <i>Absorção de fármacos na região olfatória.....</i>	<i>12</i>
2 JUSTIFICATIVA.....	15
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. OBJETIVO GERAL:.....	16
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1. O CAMUNDONGO YAC128.....	17
4.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	17
4.3. GENOTIPAGEM DOS ANIMAIS.....	18
4.4. ADMINISTRAÇÃO I.N. DO BDNF.....	19
4.5. TESTES COMPORTAMENTAIS.....	20
4.5.1. <i>Teste da preferência de sacarose (TPS).....</i>	<i>21</i>
4.5.2. <i>Teste de borrifagem da sacarose (TBS).....</i>	<i>21</i>
4.5.3. <i>Teste de suspensão pela cauda (TSC).....</i>	<i>22</i>
4.5.4. <i>Teste do nado forçado (TNF).....</i>	<i>22</i>
4.5.5. <i>Teste do campo aberto.....</i>	<i>23</i>
4.6. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	23
4.7. DOSAGEM DE BDNF MADURO ATRAVÉS DE ELISA.....	24
4.8. IMUNOHISTOQUÍMICA.....	24
4.9. QUANTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA.....	26
4.10. ANÁLISE DE SHOLL.....	26
4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
5. RESULTADOS.....	30
5.1. EFEITOS DO TRATAMENTO REPETIDO COM BDNF I.N. NO COMPORTAMENTO ANEDÔNICO EM CAMUNDONGOS YAC128.....	30

5.2. EFEITOS DO TRATAMENTO COM BDNF I.N. NO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO EM CAMUNDONGOS YAC12832	
5.3. EFEITO DO TRATAMENTO COM BDNF I.N. NOS NÍVEIS DE BDNF MADURO NO HIPOCAMPO E ESTRIADO	37
5.4. EFEITO DO TRATAMENTO COM BDNF I.N. NA PROLIFERAÇÃO CELULAR HIPOCAMPAL	38
5.5. EFEITO DO TRATAMENTO COM BDNF I.N. NA DIFERENCIAÇÃO NEURONAL HIPOCAMPAL	40
5.6. EFEITO DO TRATAMENTO COM BDNF I.N. NA ARBORIZAÇÃO DENDRÍTICA DE NEURÔNIOS IMATUROS NO GD HIPOCAMPAL	41
6. DISCUSSÃO	43
7. CONCLUSÃO	51
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	52
9. REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

1.1. A doença de Huntington

A doença de Huntington (DH) é uma doença neurodegenerativa autossômica dominante que geralmente apresenta seus sinais clínicos na meia idade e é caracterizada por distúrbios cognitivos, psiquiátricos e motores (MARTIN e GUSELLA, 1986; ROOS, 2010b). Esta doença foi citada inicialmente em 1842 por Waters (CRITCHLEY, 1984) e descrita em 1872 pelo médico George Huntington (HUNTINGTON, 1872). Em 1993, uma colaboração entre grupos de pesquisas na DH descobriu a mutação genética na doença, uma expansão instável de repetições Citosina-Adenina-Guanina (CAG) na região codificante do gene da proteína huntingtina que está localizado no braço curto do cromossomo 4 (MACDONALD *et al.*, 1993). Apesar de ser considerada uma doença rara, com uma prevalência de 5-10 casos nos Estados Unidos (ROOS, 2010a), de 12 no Reino Unido (EVANS *et al.*, 2013) de 8 no Canadá, de 5-6 na Austrália e de 2 na África do Sul (CONNELLY, 1984) a cada 100 mil habitantes esta é a doença de poliglutaminas que mais afeta pessoas no planeta. O caráter incapacitante da doença também traz consigo a questão monetária, pacientes com a DH possuem um custo social elevado, custando anualmente, direta e indiretamente, em média 4.947 dólares por pessoa nos EUA em estados iniciais e chegando a 22.582 dólares em estados tardios (DIVINO *et al.*, 2013; JONES *et al.*, 2016).

Nos estágios iniciais da DH podem ser observadas dificuldades na resolução de problemas matemáticos, irritabilidade e depressão (GIL-MOHAPEL e REGO, 2011). Os sintomas motores e a consequente

perda de coordenação de movimentos voluntários acontecem de forma gradual e lenta. Os movimentos involuntários se tornam mais frequentes e progridem até que o indivíduo afetado perderá a capacidade de se mover e se comunicar (BRANDT *et al.*, 1984; FOLSTEIN *et al.*, 1987; ALBIN *et al.*, 1990). Em estágios finais, o paciente pode sofrer de bradicinesia, rigidez severa e demência (THOMPSON *et al.*, 1988; RUIZ *et al.*, 2000; SANCHEZ-PERNAUTE *et al.*, 2000).

Em estágios pré-motores, a DH se manifesta através de diminuição das funções cognitivas e esta pode ser detectada décadas antes do aparecimento dos sintomas motores. Diversos estudos clínicos relataram uma diminuição da cognição em indivíduos afetados pela DH em fase pré-motora, com uma diminuição nas habilidades de memória visuoespacial (JASON *et al.*, 1988; LAWRENCE *et al.*, 1998), percepção temporal (RIGHI *et al.*, 2016), empatia (STOUT *et al.*, 2011; MAURAGE *et al.*, 2016) e em diversos outros testes de cognição (STOUT *et al.*, 2011).

Embora a expressão da proteína huntingtina ocorra em todo o organismo, é no sistema nervoso central (SNC) que a mutação exerce maiores prejuízos, levando inicialmente à degeneração seletiva dos neurônios estriatais (GRAVELAND *et al.*, 1985), e posteriormente das regiões corticais (HEDREEN *et al.*, 1991; ROSAS *et al.*, 2002) e cerebelares (RODDA, 1981; JESTE *et al.*, 1984).

Um dos motivos que fazem com que o estriado seja mais suscetível à degeneração é a falta de fatores tróficos nesta região devido ao menor transporte de vesículas contendo neurotrofinas na direção córtex-estriado, em especial o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (GAUTHIER *et al.*, 2004), pois este não é produzido no

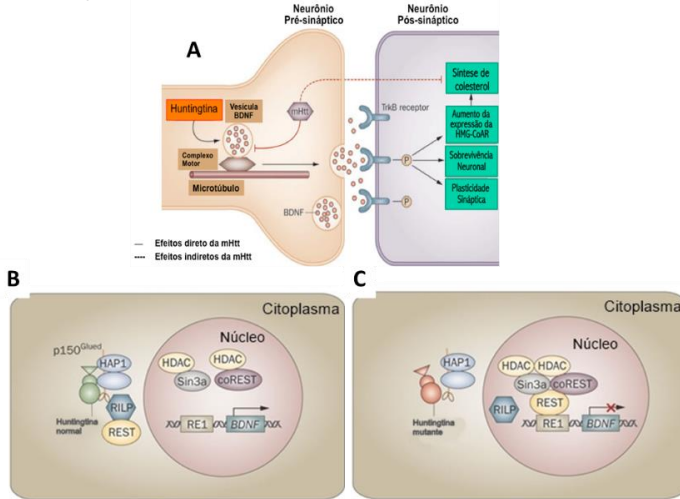
estriado em indivíduos adultos, sendo necessário o transporte anterógrado do córtex cerebral para a manutenção dos níveis adequados de BDNF nesta estrutura (BAYDYUK e XU, 2014), e este transporte é comprometido na presença da huntingtina mutante (CAVISTON e HOLZBAUR, 2009).

1.2. A proteína huntingtina

A huntingtina possui diversas funções no SNC. Uma das funções mais importantes é o transporte vesicular de substâncias, entre elas a neurotrofina BDNF, extremamente importante na manutenção e sobrevivência de algumas células específicas do SNC, especialmente neurônios (GAUTHIER *et al.*, 2004). A proteína também participa na síntese de substâncias, entre elas, o BDNF através do sequestro de fatores de silenciamento. A huntingtina mutada possui um déficit no transporte e no sequestro do fator de silenciamento, diminuindo os níveis de BDNF total na célula em estágios embrionários (DUYAO *et al.*, 1995) (Figura 1), e a inativação pode levar a hidrocefalia (DIETRICH *et al.*, 2009). A huntingtina é fundamental para o correto funcionamento do organismo e a mutação desta pode levar a diminuição da eficiência de sistemas fundamentais ao organismo, como diminuição da produção de adenosina trifosfato mitocondrial (MILAKOVIC e JOHNSON, 2005), apoptose (DRAGUNOW *et al.*, 1995), transporte vesicular sináptico (DIFIGLIA *et al.*, 1995), alteração na transcrição de alguns genes (WYTTENBACH *et al.*, 2001; SUGARS *et al.*, 2004; KUHN *et al.*, 2007), alterações no transporte de glutamato (BEHRENS *et al.*, 2002) e cálcio (KUHN *et al.*, 2007) e cascatas envolvidas com sobrevivência celular como o alvo mecanístico da rapamicina (mTOR)

(LI *et al.*, 2002; RAVIKUMAR *et al.*, 2004; WEYDT *et al.*, 2006). Em neurônios a presença da huntingtina mutada causa alterações morfológicas como diminuição do tamanho e densidade dos dendritos (SPIRES, GROTE, GARRY, *et al.*, 2004; KUHN *et al.*, 2007).

Figura 1: Funções principais da huntingtina.



Legenda: **A**) O Transporte vesicular de BDNF está relacionado ao bom funcionamento da huntingtina. Esta estabiliza o complexo dineína-dinactina aumentando sua eficiência e taxa de transporte vesicular. **B**) A huntingtina normal sequestra o REST no citoplasma prevenindo a formação de um complexo co-repressor (envolvendo Sin3a, coREST e HDAC) no sítio RE1 e permitindo que o gene do BDNF seja transcrito. **C**) A huntingtina mutada causa a entrada patológica do REST no núcleo, permitindo a formação do complexo repressor e consequentemente a diminuição da transcrição do BDNF. Abreviações: BDNF, fator neurotrófico derivado do encéfalo; coREST, co-repressor REST 1; HAP1, proteína 1 associada a huntingtina; HDAC, desacetilases de histona; RE1, elemento repressor 1; REST, fator silenciador de transcrição RE1; RILP, interação do REST com o domínio proteico LIM; Sin3a, proteína co-repressora Sin3a. Pannel A – adaptado de Karasinska, 2011 e painéis B e C- adaptado de Zuccato e Cattaneo, 2009.

Diversas evidências apontam que o número de repetições de CAG está diretamente relacionada com a gravidade e velocidade do aparecimento dos sintomas (MACDONALD *et al.*, 1993), sendo que a huntingtina normal possui de 6 a 34 repetições de glutamina (DUYAO *et al.*, 1993). Com um número de repetições entre 36 a 39 o indivíduo pode vir a apresentar os sintomas motores, mas em geral somente em idade avançada (80 anos), sendo que a partir de 40 repetições dificilmente o indivíduo não apresentará os sintomas característicos da DH (RUBINSZTEIN *et al.*, 1996).

A proteína huntingtina possui a característica de formar naturalmente aglomerados proteicos, mas estes são altamente dinâmicos, possuindo um período de vida curto, de 10 a 20 segundos na proteína normal, enquanto o tempo na proteína afetada é maior, formando agregados mais estáveis (LI *et al.*, 2016). Há uma grande discussão sobre a formação dos agregados proteicos e sua toxicidade. Alguns autores defendem que os agregados são tóxicos (SCHERZINGER *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2000; CHANG *et al.*, 2006). Por exemplo, no modelo de camundongos transgênicos R6/2 ocorre o acúmulo destes agregados seletivamente no estriado, que é a região mais afetada na DH (LI *et al.*, 2000). Por outro lado, existem trabalhos que defendem que os agregados de huntingtina não são tóxicos, mostrando que a toxicidade advinda da supressão do complexo de chaperonas ocorre independentemente destes agregados (ZHOU *et al.*, 2001). Outros trabalhos mostram que os agregados nem sempre aparecem com os sintomas da doença (SLOW *et al.*, 2005) chegando a surgir apenas meses depois que os animais apresentam os sintomas em alguns casos (MENALLED *et al.*, 2003; SLOW *et al.*, 2003).

1.3. Hipocampo na DH

Muitos trabalhos pré-clínicos e clínicos na DH tem focado na degeneração estriatal, pela forte relação aos déficits motores da doença (BERNHEIMER *et al.*, 1973; COYLE e SCHWARCZ, 1976b; a; BLOCK *et al.*, 1993). Mas, apesar dos déficits no estriado estarem bem caracterizados em modelos animais (SLOW *et al.*, 2003; SPIRES, GROTE, VARSHNEY, *et al.*, 2004; APOSTOL *et al.*, 2008), outras regiões encefálicas também são afetadas na DH como o hipocampo (SQUIRE, 1992; LAZIC *et al.*, 2004) e o cerebelo (JESTE *et al.*, 1984; FENNEMA-NOTESTINE *et al.*, 2004). A diminuição da plasticidade hipocampal ocorre antes dos sintomas motores (USDIN *et al.*, 1999; MURPHY *et al.*, 2000) e é acompanhada por comprometimento cognitivo (CIAMEI e MORTON, 2008). Alguns estudos clínicos demonstraram a ocorrência de morte neuronal nesta região (SPARGO *et al.*, 1993; ROSAS *et al.*, 2003).

O hipocampo é uma região cerebral que está relacionada com a cognição, em particular com vários aspectos de aprendizagem e memória (COLLINGRIDGE *et al.*, 2010; LEUNER e GOULD, 2010), e alterações na plasticidade sináptica hipocampal têm sido repetidamente mostradas em vários modelos transgênicos da DH (MURPHY *et al.*, 2000; GIBSON *et al.*, 2005; PANG *et al.*, 2006). Vale destacar que estas alterações são acompanhadas por um decréscimo da capacidade cognitiva (MURPHY *et al.*, 2000) e no desenvolvimento de um fenótipo depressivo (PANG *et al.*, 2009). Além disso, alguns estudos demonstraram que uma redução da capacidade neurogênica do hipocampo (uma das poucas regiões no cérebro adulto que retém a capacidade de produzir novos neurônios) pode ser detectada antes do

aparecimento dos sintomas motores em diferentes modelos transgênicos da DH (GIL *et al.*, 2004; LAZIC *et al.*, 2004; GIL *et al.*, 2005; LAZIC e BARKER, 2005; FEDELE *et al.*, 2011; SIMPSON *et al.*, 2011). Esta redução parece ter um impacto funcional uma vez que a recuperação dos déficits neurogênicos com inibidores seletivos da recaptação de serotonina como a fluoxetina e a sertralina (PENG *et al.*, 2008) resultou numa melhoria do fenótipo tipo-depressivo característico de vários modelos transgênicos da DH, nomeadamente das linhagens R6/1 (GROTE *et al.*, 2005), R6/2 (PENG *et al.*, 2008), e N171-82Q (DUAN *et al.*, 2003).

1.4. Modelos animais da doença de Huntington

Diversos modelos animais foram criados para estudar os mecanismos da doença, o primeiro modelo genético surgiu em 1996, com a inserção do gene da huntingtina mutada de um paciente em um camundongo da linhagem C57BL/6, nomeadamente o modelo R6/1 (MANGIARINI *et al.*, 1996), e os fenótipos apresentados por este animal fizeram com que este modelo fosse amplamente utilizado desde então. Novos modelos genéticos foram então criados, como os R6/2 (MANGIARINI *et al.*, 1996), BACHD (GRAY *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2013), hdhq111 (WHEELER *et al.*, 2000), N171-82Q (SCHILLING *et al.*, 1999), YAC72 e YAC128 (HODGSON *et al.*, 1999).

Os camundongos YAC128 expressam o gene inteiro da DH com 128 repetições CAG e apresentam uma degeneração seletiva dos neurônios estriatais com uma deterioração motora progressiva e uma sobrevida longa (SLOW *et al.*, 2003). Sendo assim, essa linhagem apresenta elevado grau de representatividade da condição humana (VAN

RAAMSDONK *et al.*, 2007; GIL-MOHAPEL *et al.*, 2011). Do ponto de vista comportamental, os camundongos YAC128 exibem comprometimento motor bifásico com um período inicial de hiperatividade aos 60 dias seguido por uma fase hipoativa (a partir dos 4 meses de idade), semelhante ao que é observado em indivíduos portadores da DH (VAN RAAMSDONK *et al.*, 2007). O aparecimento dos déficits motores está bem correlacionado com a perda dos neurônios estriatais nos camundongos YAC128 (SLOW *et al.*, 2003). Além disso, o acúmulo nuclear da huntingtina mutante pode ser observada no estriado desses animais logo aos 2 meses de idade, coincidindo com o aparecimento dos sintomas motores e cognitivos (VAN RAAMSDONK, MURPHY, *et al.*, 2005). Estudos recentes têm também indicado que os camundongos transgênicos YAC128 desenvolvem déficits cognitivos moderados, que precedem o aparecimento das anormalidades motoras e estes progridem com a idade (VAN RAAMSDONK, MURPHY, *et al.*, 2005), bem como comportamento tipo-depressivo nos estágios iniciais da DH, aos 3 meses de idade (POULADI *et al.*, 2009) (Figura 2). As similaridades entre o fenótipo dos camundongos YAC128 com a condição humana faz deste modelo transgênico uma excelente ferramenta para estudar os mecanismos implicados na fisiopatologia dessa doença e para testar potenciais estratégias terapêuticas que possam modificar o curso da progressão da DH (GIL-MOHAPEL *et al.*, 2011).

Figura 2: Linha do tempo que correlaciona às mudanças comportamentais e neuropatológicas da doença de Huntington em camundongos YAC128.



Legenda: Sintomas que ocorrem no YAC128 durante os primeiros 12 meses de vida. Adaptado de: Pouladi *et al.*, 2009.

1.5. Fator neurotrófico derivado do encéfalo na DH

O BDNF é membro da família das neurotrofinas, que também inclui o fator de crescimento neural (*do inglês*, nerve growth factor - NGF), a neurotrofina-3 (NT-3) e a neurotrofina-4 (NT-4), foi descoberto e isolado na década de 80 (BARDE *et al.*, 1982). O BDNF mantém a sobrevivência e a diferenciação neuronal no sistema nervoso periférico e central, participa do crescimento e direcionamento axonal e na modulação do crescimento e da morfologia dendrítica durante o desenvolvimento e é importante para a aprendizagem e memória em adultos (MAISONPIERRE *et al.*, 1990; ISLAM *et al.*, 2009).

O BDNF parece ter um papel específico na patologia da DH, pois estudos *post mortem* das estruturas cerebrais de pacientes mostraram a redução na expressão do BDNF nos núcleos putâmen e caudado (FERRER *et al.*, 2000; SEO *et al.*, 2004), no córtex cerebral (SEO *et al.*, 2004; ZUCCATO *et al.*, 2008), no estriado, cerebelo e substância negra (SEO *et al.*, 2004). Uma diminuição dos níveis de BDNF plasmático em

pacientes também foi reportada (CIAMMOLA *et al.*, 2007). Em diferentes modelos animais da DH também foi encontrada uma diminuição da expressão de BDNF no córtex cerebral (ZUCCATO *et al.*, 2005; GIRALT *et al.*, 2011) e estriado (SPIRES, GROTE, VARSHNEY, *et al.*, 2004). Além disso, tratamento com o antidepressivo sertralina aumentou os níveis de BDNF no hipocampo e estriado e melhorou o desempenho motor e diminuiu a atrofia cerebral no modelo genético de camundongos R6/2 para a DH (SPIRES, GROTE, VARSHNEY, *et al.*, 2004). Deste modo, é possível que a redução dos níveis de BDNF que ocorre em cérebros afetados com a DH esteja envolvida na disfunção hipocampal e o consequente desenvolvimento de déficits cognitivos na DH.

As evidências que mostram que o BDNF está diminuído na DH deram origem a alguns estudos envolvendo diferentes abordagens terapêuticas com o objetivo de aumentar os níveis de BDNF em modelos animais da DH. Por exemplo, um aumento por manipulação genética da expressão de BDNF no córtex cerebral e estriado de camundongos YAC128 diminuiu a perda de neurônios estriatais e melhorou a disfunção motora e o aprendizado nestes animais (GIRALT *et al.*, 2011). Ainda, o aumento da expressão de BDNF no estriado de camundongos R6/2 melhorou a conectividade cortico-estriatal e a função motora (BERNHEIMER *et al.*, 1973).

Além dos estudos citados acima que utilizaram uma manipulação mais direta dos níveis de BDNF, vários trabalhos utilizaram diferentes estratégias para modificar os níveis de BDNF como forma de tratamento em modelos animais da DH, como restrição nutricional (DUAN *et al.*, 2003), aumento da expressão de BDNF por transfecção viral

(BEMELMANS *et al.*, 1999; KELLS *et al.*, 2004; ARREGUI *et al.*, 2011), exercício físico (PANG *et al.*, 2006), tratamento com antidepressivos (PENG *et al.*, 2008; SHIEH *et al.*, 2008) e a introdução de células embrionárias e mesenquimais que produzem o BDNF (DEY *et al.*, 2010; OLSON *et al.*, 2012).

As várias estratégias para administrar BDNF no SNC incluem injeções, uso de minibombas ou terapia gênica (GILL *et al.*, 2003; DEIERBORG *et al.*, 2008). Infelizmente, muitos desses métodos são poucos práticos devido à natureza invasiva do método, possuindo pouca relevância na prática clínica (THOENEN e SENDTNER, 2002; ZUCCATO e CATTANEO, 2009). Além disso, a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de BDNF resulta em pouca difusão cerebral (BURKE *et al.*, 1994) e a administração sistêmica possui biodisponibilidade do BDNF no encéfalo muito baixa devido ao metabolismo celular. A natureza hidrofílica e macromolecular (aproximadamente 28 kDa de peso molecular, sendo 2 subunidades formadas por dímeros de 14kDa ligados não-covalentemente) do BDNF limita sua permeabilidade para passar as barreiras biológicas (CONNOR e DRAGUNOW, 1998), como a barreira hematoencefálica (SAKANE e PARDRIDGE, 1997). Portanto, existe a necessidade de testar novas formas de entrega do BDNF para o SNC de maneira segura e não invasiva.

1.6. O uso da via intranasal (i.n.) como rota de entrega de substâncias ao SNC

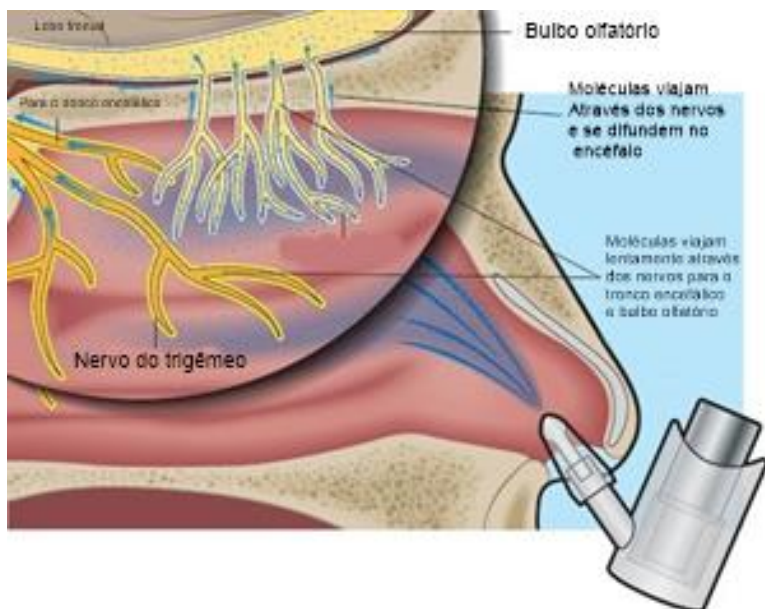
A cavidade nasal é de fácil acesso e rica em capilares sanguíneos o que permite que drogas administradas topicamente alcancem rapidamente altas concentrações sanguíneas. Além disso, os

medicamentos administrados pela via i.n. não sofrem interferência do metabolismo hepático ou má absorção pelo trato digestório (WERMELING *et al.*, 2002), e mais importante, o uso desta via possibilita a ação central de moléculas que normalmente não atravessam a barreira hematoencefálica (TALEGAONKAR e MISHRA, 2004).

A cavidade do nariz se divide em três áreas funcionais: vestíbulo nasal, região respiratória e região olfatória. A região respiratória, revestida por epitélio pseudoestratificado colunar ciliado, é a mais relevante para que ocorra absorção sistêmica das drogas administradas no nariz, enquanto a região olfatória é essencial à passagem de medicamentos para o SNC.

1.6.1. Absorção de fármacos na região olfatória

Quando o medicamento administrado pela via i.n. entra em contato com a mucosa olfatória que contem células olfatórias que se estendem até o SNC, este é transportado para o SNC, sem precisar passar pela barreira hematoencefálica e atingindo rapidamente níveis detectáveis no líquido (ALCALÁ-BARRAZA *et al.*, 2010). Um estudo realizado em ratos demonstrou que a administração i.n. de um análogo da prostaglandina D2 resulta em altas concentrações da droga no bulbo olfatório (YAMADA *et al.*, 2007). Este conceito de transferência de moléculas do nariz para o encéfalo é referenciado como a via nariz-encéfalo (Figura 3).

Figura 3: Eixo nariz-encéfalo

Legenda: Via de administração i.n. até o encéfalo em humanos
 Fonte: <http://www.blackhagendesign.com/wpcontent/uploads/2015/01/20141229143445222.jpg>

No entanto, alguns fatores podem afetar a eficácia dos medicamentos usados por via intranasal. A viscosidade excessiva do muco nasal impede a difusão do fármaco, enquanto a rápida depuração mucociliar nasal reduz o tempo de contato com o epitélio. Para melhorar a absorção i.n. dos fármacos, substâncias como os surfactantes, glicosídeos, ciclodextrinas, lipossomos, géis e glicóis, são utilizadas para ajudar a reduzir a viscosidade do muco, inibir enzimas ou aumentar a permeabilidade da membrana celular (WERMELING *et al.*, 2002; CAO *et al.*, 2007). Também podem ser utilizados veículos com polímeros mucoadesivos, como a quitosana, os quais aumentam o tempo

de contato do medicamento com a mucosa nasal (WERMELING *et al.*, 2002; MAJITHIYA *et al.*, 2006; VARSHOSAZ *et al.*, 2006).

A quitosana na concentração de 0.25% possui efeito modulador sob a barreira hematoencefálica, abrindo poros nesta e facilitando a entrada de substâncias, e esse agente consegue aumentar a quantidade do BDNF em até 13 vezes no hipocampo, sendo adequada para a utilização desta substância como veículo (VAKA *et al.*, 2012).

2 JUSTIFICATIVA

A DH é uma doença hereditária neurodegenerativa e progressiva caracterizada por uma variedade de sintomas desde déficits motores até sintomas psiquiátricos como a depressão, anedonia e disfunção cognitiva. Existem evidências que o hipocampo é uma das regiões encefálicas implicada na DH porque entre os sintomas pré-motores estão déficits na memória espacial e sintomas depressivos, comportamentos regulados pelo hipocampo. No entanto, poucos estudos têm investigado esta estrutura na DH. Portanto, investigar se o tratamento com BDNF em camundongos YAC128, um modelo animal com o desenvolvimento gradual dos sintomas vistos na DH, terá um valor terapêutico na modulação do comportamento tipo-depressivo, anedônico, bem como das alterações bioquímicas e estruturais características justificando assim a utilização deste modelo animal neste trabalho. Destaca-se ainda que o uso de uma estratégia terapêutica não invasiva como a administração i.n. de BDNF, poderá ter um impacto clínico significativo, uma vez que esta permite a manipulação de circuitos neuronais cerebrais sem causar efeitos colaterais significantes.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

Avaliar os efeitos da administração i.n. de BDNF nos comportamentos tipo-depressivo e anedônico e na neuroplasticidade nos camundongos YAC128.

3.2. Objetivos Específicos:

1. Investigar se a administração i.n. repetida de BDNF é capaz de prevenir o aparecimento de comportamento tipo-depressivo e anedônico em camundongos YAC128 e alterar os níveis de BDNF estriatal e hipocampal;
2. Verificar se a administração repetida de BDNF via i.n. é capaz de promover a proliferação celular e diferenciação neuronal no giro denteado (GD) hipocampal em camundongos YAC128;
3. Investigar se a administração repetida de BDNF via i.n. é capaz de alterar a arborização dendrítica de neurônios imaturos no GD hipocampal.

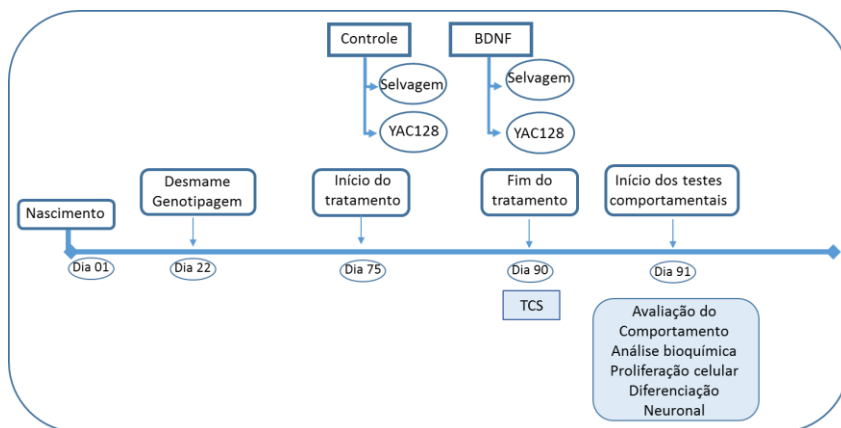
4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. O camundongo YAC128

Foram utilizados camundongos de ambos os sexos selvagens (n=45) e YAC128 (n=39), com 2 meses de idade. Todos os animais foram gerados na nossa colônia local a partir de um casal de animais gentilmente cedidos pelo professor Dr. Brian Christie (University of Victoria, BC, Canada). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com dimensões de 30x20x13 cm no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica na Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, SC, Brasil) em estantes ventiladas e climatizadas a 21-23°C com livre acesso à água e comida, sob um ciclo claro-escuro de 12:12h (07:00-19:00).

4.2. Protocolo Experimental

Aos 75 dias de idade, os animais de ambos os sexos foram divididos em dois grandes grupos: 1- Controle (camundongos YAC128 e selvagens que receberam a solução veículo por via i.n. por 15 dias); 2- BDNF (camundongos YAC128 e selvagens que receberam BDNF (1,6 ug/kg/dia) via i.n. por 15 dias. O grupo controle recebeu uma solução de quitosana (0,25%) (figura 4). Os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais utilizados e o sofrimento dos animais. Os procedimentos experimentais foram aprovados na Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA), sob protocolo n° PP00944.

Figura 4: Protocolo experimental

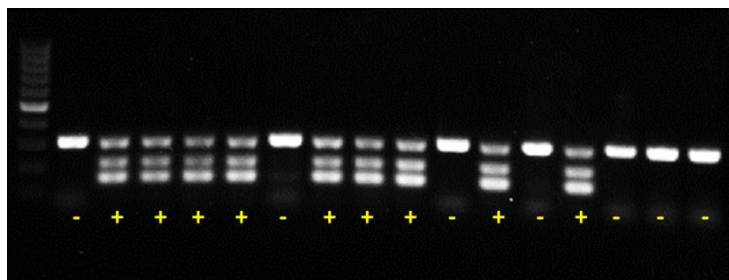
Legenda: Os animais YAC128 e selvagens receberam o tratamento i.n. por 15 dias, sendo: BDNF (1,66 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$) ou solução veículo (quitosana 0,25%) 5 μl por dia, alternando a narina a cada dia. Decorridas 24 horas após a última administração os animais foram submetidos aos testes comportamentais. Ao final dos testes comportamentais os animais foram eutanasiados para a coleta das amostras para a análise bioquímica e morfológica.

4.3. Genotipagem dos animais

Amostras de tecido da orelha coletadas no momento do desmame dos camundongos foram utilizadas para a extração do DNA. Brevemente, após a retirada do tecido, estes foram colocados em eppendorfs com solução de lise nucléica contendo Master mix (0,5M EDTA, proteinase K e RNase A) por 3 horas a 55°C. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas e o sobrenadante foi retirado posteriormente. Foi adicionado tampão de lise e tampão de lavagem (3 vezes), sendo centrifugada a cada adição dos tampões a 13000g por 3 minutos e 1 minuto respectivamente para isolar o DNA. Posteriormente foi adicionado o DNA em solução de 8 μl contendo Master Mix Go Taq

e primers específicos e encaminhado para um aparelho de reação de cadeia da polimerase (PCR) para multiplicação do DNA e posterior análise através de eletroforese (HOFSTETTER *et al.*, 1997).

Figura 5: Exemplo do gel da genotipagem dos camundongos YAC128



Legenda: Os símbolos (+) indicam animais positivos para a mutação (YAC128) e o (-) indicam animais negativos para a mutação (selvagens). Fonte: o autor.

4.4. Administração i.n. do BDNF

A administração de BDNF (Prospec®) foi realizada por 15 dias através de micropipeta para dispensa de 5 microlitros de uma solução de quitosana (0,25%) contendo BDNF (1,66 µg/kg) em cada narina alternando a cada dia (VAKA *et al.*, 2012). A manipulação dos camundongos para a administração i.n. de BDNF está ilustrada abaixo (Figura 6). Brevemente, cada camundongo foi individualmente retirado da sua caixa pela base da cauda, e apoiado na tampa da gaiola. O animal foi suspenso pela pele da região dorso-cervical, entre o dedo indicador e polegar do experimentador. Em seguida a cauda do camundongo foi fixada entre os outros dedos e a palma da mão, para a limitação total de seus movimentos de modo a facilitar o procedimento de administração do BDNF. Enquanto a manipulação não ocorria, os

animais permaneceram nas gaiolas plásticas com comida e água *ad libitum*. A via i.n. é uma técnica eficiente, não invasiva, de fácil administração e pode ser repetida sem problemas ao longo do tratamento (SIMMONS *et al.*, 2009; ALCALÁ-BARRAZA *et al.*, 2010; XIE *et al.*, 2010).

Figura 6: Administração i.n. de BDNF realizada nos animais



Legenda: Modo de administração realizada nos animais. Fonte: O autor.

4.5. Testes Comportamentais

Foi utilizada uma bateria de testes para verificar o comportamento emocional dos animais. Os testes foram organizados em três grupos. Um grupo de animais (n=28) realizou os seguintes testes: teste da preferência pela sacarose (TPS), teste da suspensão pela cauda

(TSC) e teste do nado forçado (TNF). O segundo grupo (n=36) foi utilizado para os testes de campo aberto, teste da borrifagem da sacarose, e da esQUIVA inibitória. Todos os testes comportamentais foram gravados utilizando uma câmara Webcam Logitech C920 acoplada a um notebook Dell Vostro 5470 utilizando o software Any-maze (Stoelting Co., U.S.A.). Quando a contagem teve que ser manual o experimentador foi cego em relação ao genótipo e ao tratamento dos animais.

4.5.1. Teste da preferência de sacarose (TPS)

Para o TPS, os animais foram ambientados durante o tratamento com 2 garrafas de água. No dia do teste foram separados em gaiolas individuais contendo 2 garrafas, uma com água e outra com solução de sacarose a 2% por 24 horas. Para prevenir uma possível preferência a um dos lados da caixa, as garrafas foram invertidas depois de 12 horas. O consumo de sacarose foi estimado baseado na quantidade de solução restante. A preferência foi calculada pela porcentagem de sacarose consumida do total de líquido consumido. Não houve privação de água ou comida antes do teste. Animais com o comportamento tipo-depressivo apresentam anedonia, diminuindo a preferência pela sacarose (BBIOMEDSC, 2013).

4.5.2. Teste de borrifagem da sacarose (TBS)

O TBS foi utilizado para avaliar o comportamento de auto-limpeza (“grooming”) dos animais, após a borrifagem dos mesmos com solução de sacarose a 10% no dorso. O tempo em que o animal permaneceu neste comportamento foi cronometrado durante 5 minutos (DUCOTTET *et al.*, 2004). O TBS é um teste que afere a anedonia e motivação, uma vez que animais submetidos a modelos

comportamentais de depressão apresentam um menor tempo de autolimpeza quando comparados aos animais controle (KALUEFF, 2002; KALUEFF e TUOHIMAA, 2004). Em modelos animais de depressão, a administração crônica de antidepressivos clássicos aumenta o tempo despendido neste comportamento (YALCIN *et al.*, 2005).

4.5.3. Teste de suspensão pela cauda (TSC)

Foi analisado o período total de imobilidade e a latência para a primeira imobilidade utilizando o método descrito por STERU em 1985 (STERU *et al.*, 1985). Os camundongos foram suspensos pela cauda através de fita adesiva por 6 minutos a 80 cm do chão. Animais com comportamento tipo-depressivo possuem o tempo de imobilidade maior e latência reduzida e a utilização de antidepressivos reverte esses efeitos (CASTAGNÉ *et al.*, 2011).

4.5.4. Teste do nado forçado (TNF)

Os animais foram colocados individualmente em tanques cilíndricos de policloreto de vinila com 24 x 10 cm de altura x diâmetro contendo água até 19 cm de altura mantida em $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Os testes foram registrados em AnyMaze® e posteriormente foram contabilizados a latência para a primeira imobilidade e o tempo total de imobilidade. Os camundongos foram considerados imóveis quando estes pararam de nadar e permaneceram imóveis na água, executando movimentos apenas para manter a cabeça fora da água. Diminuição no tempo de imobilidade é um indicativo de efeito tipo-antidepressivo, enquanto um aumento neste tempo é considerado efeito tipo-depressivo (CAN *et al.*, 2012).

4.5.5. Teste do campo aberto

Para verificar se o tratamento com BDNF alterou a locomoção dos animais e por consequência afetou as respostas comportamentais do TNF e do TSC foi utilizado o teste do campo aberto. Neste teste a locomoção e ansiedade podem ser avaliadas através da distância total percorrida e do tempo gasto no centro da arena, respectivamente. Os animais foram colocados individualmente na arena do campo aberto, de modo a mensurar a atividade locomotora durante 6 minutos. A distância total percorrida e o tempo gasto no centro da arena neste período foram analisada pelo software AnyMaze®. O campo aberto foi limpo com álcool 10% após cada teste, para evitar pistas olfatórias.

4.6. Preparação das amostras

Após os testes comportamentais, um grupo de animais foi eutanasiado por deslocamento cervical para retirada do estriado e hipocampo para avaliar os níveis de BDNF (CHIU *et al.*, 2007); e outro grupo de animais sofreu perfusão cardíaca com solução salina a 0,9% seguida de paraformaldeído a 4% (PFA), após a anestesia com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg). Os encéfalos foram retirados da calota craniana e colocados em frascos de vidro contendo PFA 4% por 12h e após foram transferidos para solução de sacarose 30%. Após a saturação do tecido com a sacarose, estes foram cortados serialmente (séries de 6) em orientação coronal através de vibrátomo (Vibratome, Series 1000, St. Luis, Mo, EUA ®) com espessura de 30 μ m. As fatias foram coletadas em placas com 6 poços com solução de azida 0,5% e tampão fosfato (PBS) em geladeira (4°C) para posterior análise.

4.7. Dosagem de BDNF maduro através de ELISA

Foi utilizado um kit da Promega (Madison, Wisconsin, EUA) e o procedimento realizado seguiu as instruções do fabricante. Brevemente, as placas foram revestidas usando 10 µl de anticorpo monoclonal anti-BDNF em 9.99 ml de tampão carbonato e foram adicionados 100 µl da solução em cada poço da placa, durante uma noite em geladeira a +4°C. 12 horas depois foi colocada solução bloqueadora na placa por uma hora, depois preparada uma curva padrão de 7.8 a 500 pg/ml. As amostras foram preparadas a partir da homogeneização, centrifugação e retirada do sobrenadante. O sobrenadante foi incubado por 2 h. Foi adicionado então 100 µl em cada poço de uma solução de 20 µl de anticorpo policlonal anti-BDNF em 9.98 ml de solução tampão e incubadas por 2 horas, e em seguida lavadas com tampão carbonato. Foi adicionada 50 µl em cada poço de uma solução de 50 µl anticorpo IgY em 9.95 ml de solução tamponante, mantida por uma hora e depois lavada. Para o desenvolvimento da cor, foi utilizada TMB One solution com 1N de ácido clorídrico. A visualização da absorbância foi através de espectrofotômetro a 450nm. Os resultados foram apresentados como uma razão entre os níveis de absorbância do BDNF em relação a curva padrão e os níveis totais de proteína. A dosagem de proteínas foi realizada de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando albumina bovina como padrão.

4.8. Imunohistoquímica

Para avaliar a proliferação de células no GD hipocampal, foi utilizado o marcador da proteína endógena, o ki-67. O ki-67 é expresso em quase todo o ciclo celular G1, S, G2 e M, exceto na fase de descanso

(G0). Para quantificar a diferenciação neuronal foi utilizada a proteína endógena doublecortina (DCX) que é expressa em neurônios imaturos. Para a marcação de ki-67, as fatias foram pré-incubadas com ácido cítrico 10 mM (pH 6.0) por 10 minutos (divididos em 2 vezes de 5 minutos) a 95 °C com 20 minutos de intervalo entre elas. Foram então pré-incubadas com solução de soro de cabra por 1 hora e depois incubadas com o anticorpo primário policlonal anti-ki67 (1:500; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) feito em coelho, por 48 horas a 4°C. As fatias foram então lavadas e incubadas com o anticorpo secundário (biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG, 1:200; Vector Laboratories) por 2 horas, lavados e incubados com a solução ABC (Vectastain ABC Elite Kit PK4000; Vector Laboratories) por 1 hora e marcada com DAB (DAB; DAB kit SK 4100; Vector Laboratories) por cerca de 3 minutos. As fatias foram então montadas em lâminas gelatinizadas, desidratadas com soluções crescentes de etanol e em seguida incubadas em xilol (Synth, Diadema, SP, Brasil) e cobertas com Entellan (Merck Millipore, Billerick, Massachusetts, EUA) seguidos por lamínula. De modo similar, a marcação de DCX ocorreu com a exposição inicial das fatias com solução de água oxigenada a 3% e metanol a 10% em solução tampão de fosfato, lavadas e pré-incubadas em solução de 5% de soro cavalo e Triton, incubadas posteriormente em soro de cabra anti-DCX (1:400; Santa Cruz Biotechnology) por 48 horas a +4°C. Após este período, as fatias foram incubadas com solução de 2% de anticorpo secundário anti-cabra feito em cavalo (biotin-conjugated horse anti-goat IgG, 1:200; Vector Laboratories) por 2 horas, lavados e incubados com solução ABC da Vectastain por 1 hora, lavadas e desenvolvidas em DAB por 3 minutos. As fatias foram então montadas

em lâminas gelatinizadas, desidratadas com soluções crescentes de etanol e em seguida incubadas em xilol (Synth, Diadema, SP, Brasil) e cobertas com Entellan e lamínula.

4.9. Quantificação Morfológica

A contagem das células positivas para o ki-67 e para a DCX foi feita por 2 pesquisadores cegos ao experimento utilizando um microscópio óptico (Olympus CX21). Todas as fatias ao longo do eixo dorso/ventral do hipocampo contendo o GD foram usadas para a análise, resultando em 10-12 fatias por poço. Todas as células positivas na ZSG de cada GD foram contadas. Os resultados foram expressos como número total de células positivas multiplicando médias aritméticas de cada hipocampo por 73, que é a quantidade de fatias de 30 μm contendo o hipocampo no encéfalo de camundongo, para estimar o número total de células positivas em todo o GD.

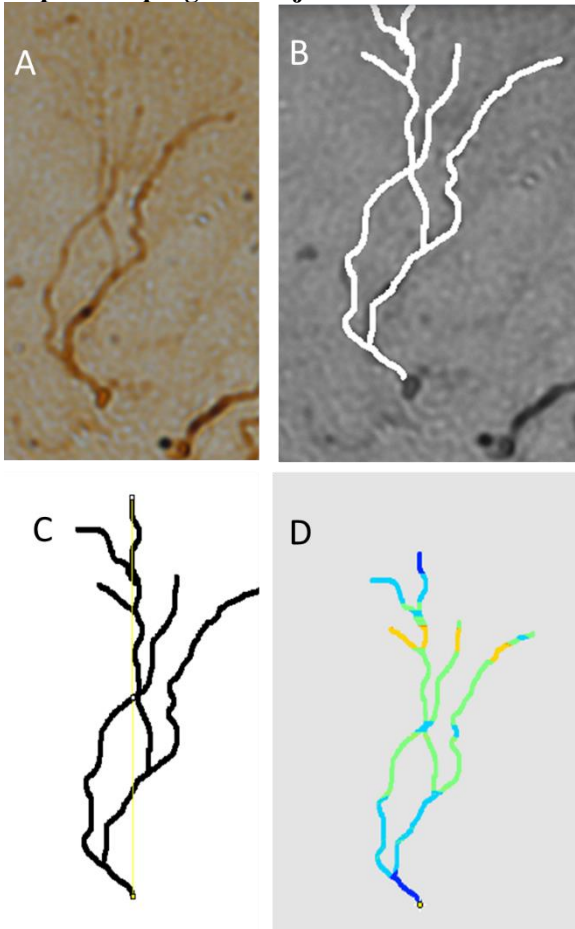
4.10. Análise de Sholl

Para a aquisição das imagens para a análise de Sholl foi utilizado um microscópio óptico invertido modelo Olympus IX83, acoplado com uma câmera digital Olympus DP73 (17 megapixels) através do software CellSens Dimension 1.72.

Foram fotografadas 5 fatias hipocampais marcadas para a DCX, de cada animal (n=4-5 animais/grupo) com ampliação de 400x. A análise de Sholl foi feita através do programa Fiji, versão 1.51J criado a partir do programa de código aberto imageJ (RASBAND, 2016). A ramificação dendrítica visível foi marcada em branco através da ferramenta “pencil” com um raio de 10 pixels, a partir do soma,

transformadas em preto e branco e marcadas através da ferramenta “threshold”, resultando em uma foto branca com o contorno preto anteriormente marcado (Figura 7). Foi traçada uma reta com a ferramenta “straight” no Fiji do início do traçado, onde originalmente estaria o soma, até o ponto mais distante da ramificação. A partir deste traçado foi executada a análise de Sholl através do próprio plugin do Fiji.

Figura 7: Resumo da transformação da fotografia de um neurônio marcado com DCX até a figura representativa da análise de Sholl completa no programa Fiji



Legenda: Transformação das fotos até a execução da análise de Sholl. A – Foto de um neurônio marcado com DCX (zoom de 400x). B – Ramificação traçada com a ferramenta lápis e convertida em preto e branco. C – Marcação do traçado da ramificação dendrítica em preto e branco e utilizada a ferramenta régua para determinar o local da análise de Sholl. D – Figura representativa do resultado da análise de Sholl.

4.11. Análise Estatística

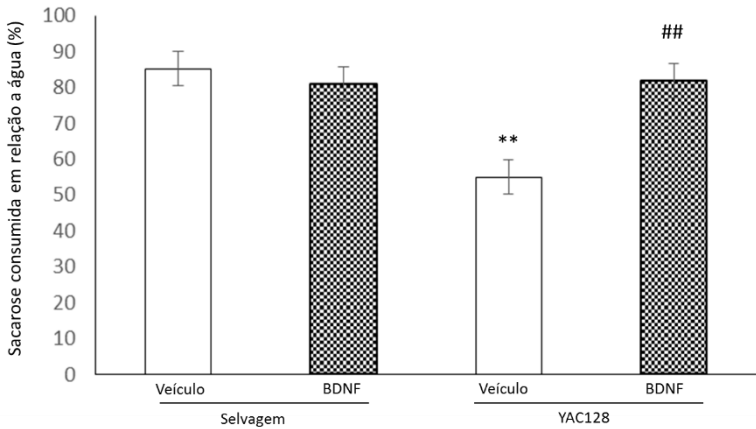
Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statistica 10 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA). Os animais machos e fêmeas foram analisados juntos por não haver diferença estatística nos testes executados neste trabalho. Foi realizada análise de variância (ANOVA) de 2 vias para o genótipo (selvagem x YAC128) e para o tratamento (veículo x BDNF) para os testes comportamentais que visavam verificar o comportamento tipo-depressivo e as análises morfológicas. Quando houve diferença estatística entre os genótipos ou tratamentos, mas não houve interação, foi utilizado um teste T de Student para verificar estas diferenças. A análise de Sholl foi realizada usando ANOVA de medidas repetidas. Os testes estatísticos foram seguidos por uma análise post-hoc de Newman-Keuls quando apropriado, exceto na ANOVA de medidas repetidas onde foi utilizada análise de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Efeitos do tratamento repetido com BDNF i.n. no comportamento anedônico em camundongos YAC128

A Figura 8 mostra que os camundongos YAC128 possuem um comportamento anedônico caracterizado pela diminuição no consumo de sacarose em relação ao grupo controle. O tratamento com BDNF foi capaz de prevenir essa diminuição no consumo no TPS. A ANOVA de duas vias revelou diferença significativa para o tratamento [$F(1,24) = 5,81, p < 0,05$], genótipo [$F(1,24) = 9,65, p < 0,01$] e para a interação tratamento x genótipo [$F(1,24) = 10,82, p < 0,01$].

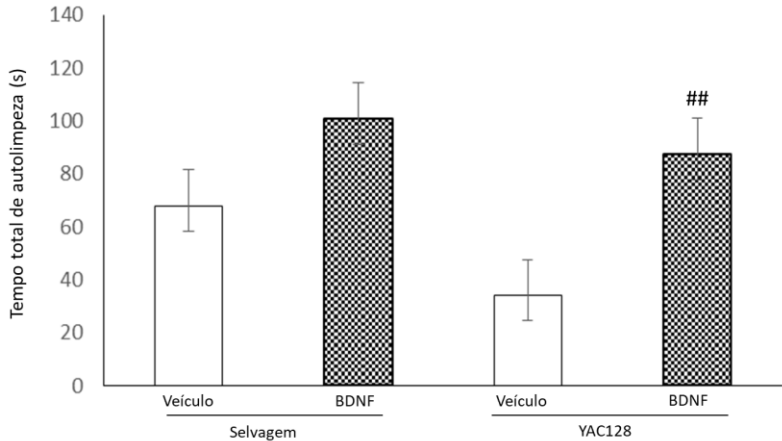
Figura 8: Avaliação do tratamento repetido com BDNF i.n. no comportamento anedônico dos camundongos YAC128 no teste de preferência a sacarose



Legenda: Efeito da administração i.n. de BDNF (1,66 µg/kg) ou veículo (0,25% quitosana) por 15 dias no comportamento anedônico dos camundongos YAC128 e selvagens testados no teste de preferência a sacarose. Os dados são apresentados como média ± E.P.M. (n=7).
 ** p<0,01 quando comparado ao grupo selvagem tratado com veículo.
 ## p<0,01 quando comparado com o grupo YAC128 tratado com veículo.

Os camundongos YAC128 apresentaram uma diminuição do tempo de autolimpeza no TBS e o tratamento com BDNF foi capaz de reverter este efeito. A ANOVA de duas vias revelou diferença significativa para o tratamento [F (1, 29) = 15,58, p<0,01], genótipo [F (1,29) = 4,69, p<0,05], mas não para a interação tratamento x genótipo [F (1,29) = 0,87, p=0,35]. O teste t revelou diferença no tratamento (p<0,01) mas não entre os genótipos (p=0,09) (figura 9).

Figura 9: Avaliação do tratamento repetido com BDNF i.n. no comportamento anedônico dos camundongos YAC128 no teste de borrfagem de sacarose



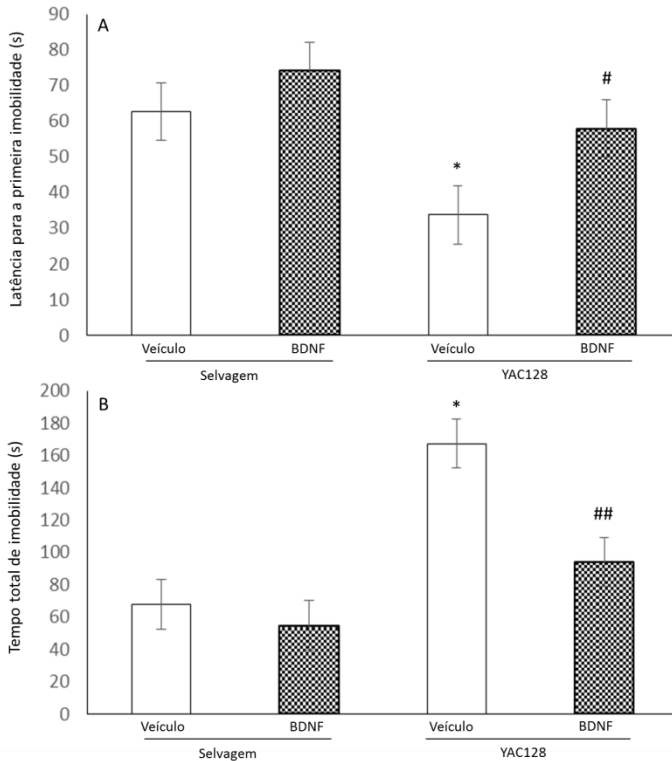
Legenda: Efeito da administração de BDNF i.n. (1,66 µg/kg) ou veículo (0,25% quitosana) por 15 dias no comportamento anedônico dos camundongos YAC128 e selvagem no teste de borrfagem de sacarose. Os dados são apresentados como média ± E.P.M. (n=6-10) ^{##}p<0,01 quando comparado ao grupo YAC128 tratado com solução veículo.

5.2. Efeitos do tratamento com BDNF i.n. no comportamento tipo-depressivo em camundongos YAC128

A Figura 10 mostra um comportamento tipo-depressivo dos camundongos YAC128 verificado pela diminuição no tempo de latência para a imobilidade (painel A), bem como pelo aumento no tempo total de imobilidade (painel B) no TSC. O tratamento com BDNF foi capaz de prevenir tanto a redução da latência quanto o aumento do tempo de imobilidade dos camundongos YAC128 no TSC. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo para o tratamento [$F(1,24) = 4,85$, $p < 0,05$] e para o genótipo [$F(1,24) = 7,86$, $p < 0,01$], mas não para a

interação genótipo x tratamento [$F(1,24) = 0,62, p=0,44$], em relação a latência, e efeito significativo para o tratamento [$F(1,24) = 8,06, p<0,01$] e para o genótipo [$F(1,24) = 20,76, p<0,01$] e não houve interação entre genótipo x tratamento [$F(1,24) = 3,94, p=0,06$], em relação ao tempo de imobilidade no TSC. Foi encontrada diferença estatística no genótipo ($p<0,05$) e no tratamento ($p<0,05$) no tempo para a primeira imobilidade. No tempo total de imobilidade foi encontrada diferença estatística entre o genótipo ($p<0,05$) e entre o tratamento ($p<0,01$).

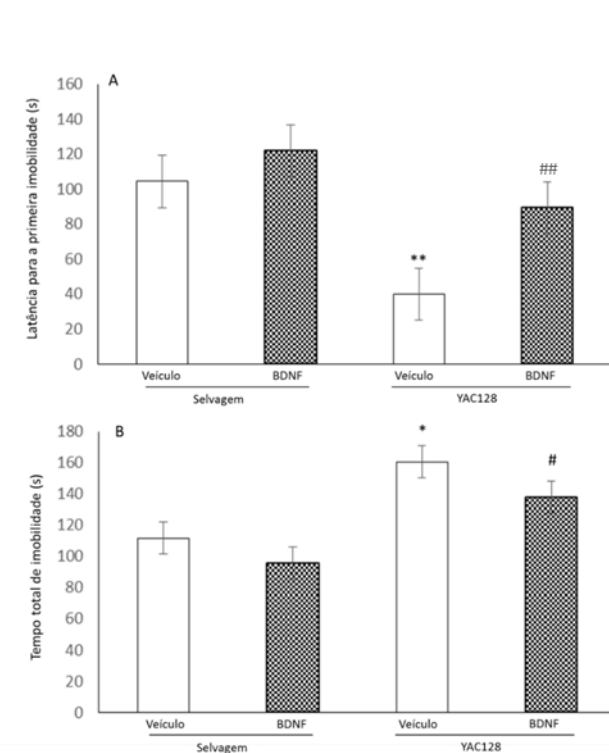
Figura 10: Avaliação do tratamento repetido com BDNF i.n. no comportamento tipo-depressivo dos camundongos YAC128 no teste de suspensão pela cauda



Legenda: Efeito da administração de BDNF i.n. (1,66 µg/kg) ou veículo (0,25% quitosana) por 15 dias no comportamento tipo-depressivo dos camundongos YAC128 e selvagem no teste de suspensão pela cauda. Os dados são apresentados como média ± E.P.M. (n=7). A – Tempo até o primeiro evento de imobilidade (latência) B – Tempo total de imobilidade no teste do nado forçado. *p<0,05 quando comparado ao grupo selvagem tratado com veículo. #p<0,05, ##p<0,01 quando comparado ao grupo YAC128 tratado com solução veículo.

A Figura 11 mostra um comportamento tipo-depressivo dos camundongos YAC128 verificado tanto pela diminuição no tempo de latência para a imobilidade (painel A), quanto pelo aumento no tempo total de imobilidade (painel B) no TNF. O tratamento com BDNF foi capaz de prevenir ambos os parâmetros no TNF. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo para o tratamento [$F(1,24) = 5,12$, $p < 0,05$] e para o genótipo [$F(1,24) = 10,74$, $p < 0,01$], mas não houve interação entre o genótipo x tratamento [$F(1,24) = 1,16$, $p = 0,29$] em relação a latência para a imobilidade. Houve efeito significativo para o genótipo [$F(1,24) = 19,37$, $p < 0,01$] mas não houve para o tratamento [$F(1,24) = 3,52$, $p = 0,07$] ou para a interação [$F(1,24) = 0,10$, $p = 0,75$], em relação ao tempo total de imobilidade. Foi encontrada diferença significativa entre genótipo ($p < 0,01$) e tratamento ($p < 0,01$) na latência para a primeira imobilidade. Também foi encontrada diferença entre o genótipo ($p < 0,05$) e o tratamento ($p < 0,05$) no tempo total de imobilidade.

Figura 11: Avaliação do tratamento repetido com BDNF i.n. no comportamento tipo-depressivo dos camundongos YAC128 no teste do nado forçado



Legenda: Efeito da administração de BDNF i.n. (1,66 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ou veículo (0,25% quitosana) por 15 dias no comportamento tipo-depressivo dos camundongos YAC128 e selvagem no teste do nado forçado. Os dados são apresentados como média \pm E.P.M. (n=7) A – Tempo para a primeira imobilidade (latência) B – tempo total de imobilidade no teste de nado forçado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo selvagem tratado com veículo. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ quando comparado com YAC128 tratado com veículo.

De modo a avaliar se o BDNF modificou a atividade locomotora ou o comportamento tipo-ansioso nestes animais, foi

executado o teste de campo aberto para distância total percorrida e tempo total no centro, respectivamente. A ANOVA de duas vias revelou que não existe diferença entre as variáveis genótipo [F (1,32) = 2,80, p=0,10], tratamento [F (1,32) = 0,27, p=0,61] e interação [F (1,32) = 0,10, p=0,75].

Tabela 1 – Efeitos da administração i.n. repetida de BDNF recombinante humano na atividade locomotora nos camundongos YAC128 e selvagem.

Genótipo	Tratamento	Distância (m)	Tempo no centro (s)	N
Selvagem	Veículo	28.86 ± 1.37	8.12 ± 1.33	8
YAC128	Veículo	27.59 ± 1.58	8.23 ± 1.54	6
Selvagem	BDNF	26.74 ± 1.37	10.22 ± 1.33	8
YAC128	BDNF	25.22 ± 1.29	8.28 ± 1.26	9

Legenda: O teste de campo aberto determinou a distância percorrida (m) e o tempo gasto (s) no centro do campo aberto nos camundongos YAC128 e selvagens por 6 minutos usando o programa Any-maze. Resultados estão apresentados como média ± E.P.M..

5.3. Efeito do tratamento com BDNF i.n. nos níveis de BDNF maduro no hipocampo e estriado

Os níveis de BDNF maduro foram mensurados no hipocampo e estriado dos camundongos YAC128 e selvagens tratados com BDNF ou veículo através do ensaio de imunoabsorção enzimática (ENGVALL e PERLMANN, 1971) da marca PROMEGA. Os resultados estão sumarizados na tabela 2 como média ± E.P.M..

Tabela 2 – Efeitos da administração repetida de BDNF recombinante humano nos níveis de BDNF maduro no hipocampo e estriado de camundongos YAC128 e selvagem aos 3 meses de idade

Região	Genótipo	Tratamento	Níveis de BDNF maduro	E.P.M.
Hipocampo	Selvagem	Veículo	29.48	± 1.94
	YAC128	Veículo	29.46	± 1.34
	Selvagem	BDNF	31.94	± 0.46
	YAC128	BDNF	28.21	± 2.48
Estriado	Selvagem	Veículo	27.44	± 0.83
	YAC128	Veículo	27.46	± 0.62
	Selvagem	BDNF	28.34	± 0.99
	YAC128	BDNF	27.97	± 0.37

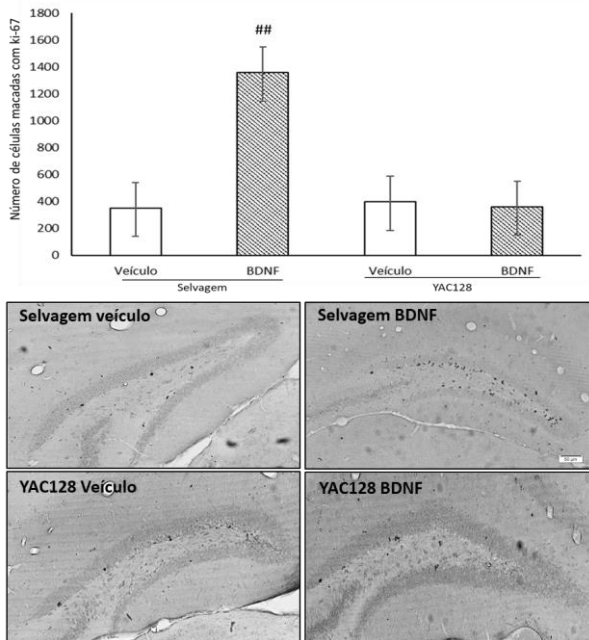
Legenda: Níveis de BDNF maduro estão expressos como pg/mg de proteína. Resultados apresentados como Média ± E.P.M (n = 5/grupo).

5.4. Efeito do tratamento com BDNF i.n. na proliferação celular hipocampal

Para analisar o efeito do tratamento do BDNF i.n. sobre a proliferação celular hipocampal, foi utilizada uma marcação de imunohistoquímica para a proteína endógena ki-67 que é expressa durante as fases ativas do ciclo celular (SCHOLZEN e GERDES, 2000). A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do genótipo [$F(1,18) = 4,72, p < 0,05$], do tratamento [$F(1, 18) = 5,59, p < 0,05$], e do tratamento x genótipo [$F(1, 18) = 6,4, p < 0,05$] no número de células positivas para o marcador ki-67 ao longo da ZSG do GD hipocampal. A análise de post-hoc revelou um aumento significativo no número de

células marcadas no grupo selvagem tratado com BDNF ($p < 0.05$) (figura 12).

Figura 12: Avaliação do tratamento repetido com BDNF i.n. na proliferação celular hipocampal

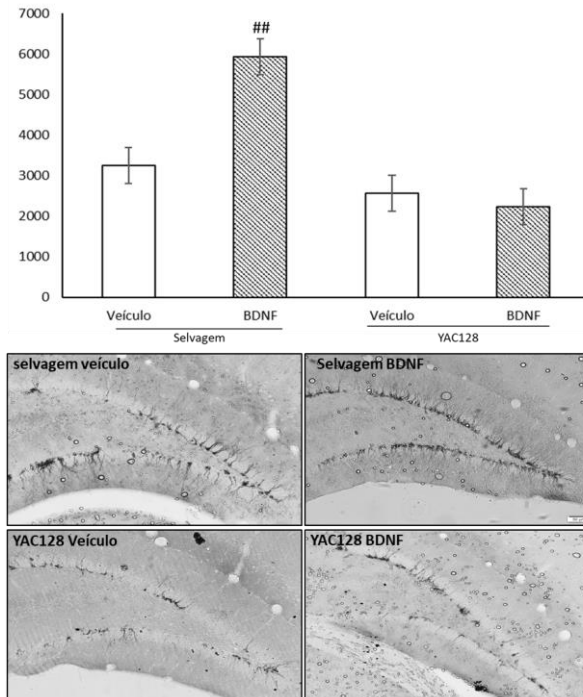


Legenda: Efeito da administração de BDNF i.n. (1,66 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ou veículo (0,25% quitosana) por 15 dias na diferenciação celular no GD hipocampal de animais YAC128 e selvagem com 3 meses de idade **A** – Gráfico com as médias \pm E.P.M. ($n = 4-6$). ^{##} $p < 0,01$ quando comparado ao grupo selvagem tratado com veículo. **B** – Imagens representativas (aumento de 100x) do giro dentado de animais YAC128 e selvagem, com marcação para a proteína endógena de proliferação celular ki-67, que passaram pelo tratamento com BDNF ou veículo.

5.5. Efeito do tratamento com BDNF i.n. na diferenciação neuronal hipocampal

Para avaliar os efeitos da administração de BDNF i.n. na diferenciação neuronal, imunohistoquímica contra a proteína DCX, uma proteína do citoesqueleto expressa em neurônios (GLEESON *et al.*, 1998; COUILLARD-DESPRES *et al.*, 2001; BROWN *et al.*, 2003; COUILLARD-DESPRES *et al.*, 2005), foi realizada. A ANOVA de duas vias revelou uma diferença estatística significativa no efeito do tratamento [$F(1, 16) = 6,85, p < 0,05$], do genótipo [$F(1, 16) = 23,99, p < 0,01$], e da interação genótipo x tratamento [$F(1, 16) < 11,46, p < 0,01$] no número total de células DCX positivas ao da ZSG do GD hipocampal. O teste de post-hoc revelou que o tratamento com BDNF aumentou significativamente o número de neurônios imaturos no grupo selvagem ($p < 0,05$) (Figura 13).

Figura 13: Avaliação do tratamento repetido com BDNF i.n. na diferenciação neuronal



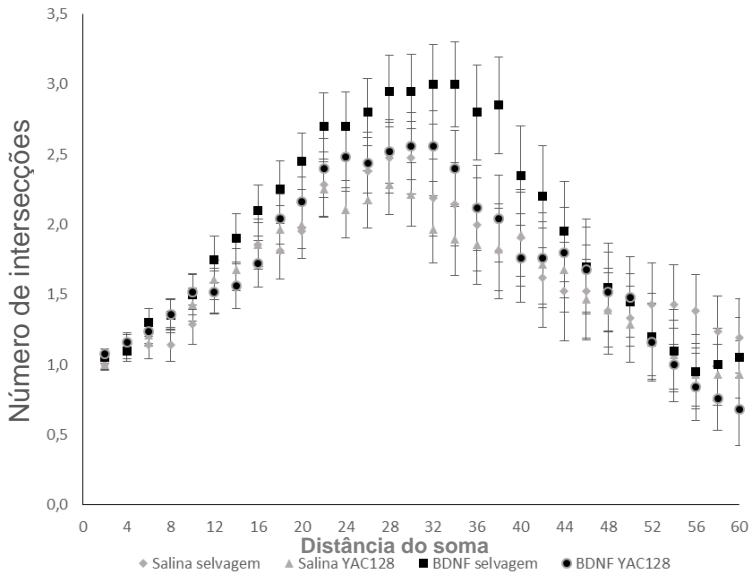
Legenda: **A** – Efeito da administração de BDNF i.n. (1,66 µg/kg) ou veículo (0,25% quitosana) por 15 dias na diferenciação celular no GD hipocampal de camundongos YAC128 e selvagem com 3 meses de idade. **A** – Gráficos com as médias ± E.P.M. (n = 4-6). ^{##}p<0,01 quando comparado ao selvagem tratado com veículo. **B** – Imagens representativas (aumento de 100x) do GD de animais YAC128 e selvagem, marcadas para a proteína endógena de diferenciação neuronal DCX, que passaram pelo tratamento com BDNF ou veículo.

5.6. Efeito do tratamento com BDNF i.n. na arborização dendrítica de neurônios imaturos no GD hipocampal

Para avaliar se o tratamento repetido com BDNF altera a arborização dendrítica em neurônios imaturos a análise de Sholl foi realizada em neurônios marcados com a proteína DCX. A ANOVA de

medidas repetidas revelou diferença significativa do tratamento [$F(30,61) = 1,83, p < 0,05$], mas não encontrou diferença entre genótipos [$F(30, 61) = 0,85, p = 0,67$] e nem na interação genótipo x tratamento [$F(30, 61) = 1,0853, p = 0,38$] (Figura 14).

Figura 14: Avaliação do tratamento repetido com BDNF i.n. na arborização dendrítica dos neurônios marcados com DCX



Legenda: Efeito da administração de BDNF i.n. (1,66 μg/kg) ou veículo (0,25% quitosana) por 15 dias na análise na arborização dendrítica nos primeiros 60 μm a partir do soma em neurônios marcados com DCX (análise feita a cada 2 μm) no GD hipocampal. Resultados apresentados como média ± E.P.M. (n = 4-5).

6. DISCUSSÃO

A DH é uma doença neurodegenerativa fatal que é caracterizada por uma variedade de sintomas motores, cognitivos e psiquiátricos (SHOULSON e FAHN, 1979; PAULSEN *et al.*, 2001). Apesar do tratamento dos sintomas não levar a cura da DH, novas estratégias podem trazer melhora na qualidade de vida dos pacientes com a DH. Os modelos genéticos são os mais utilizados para estudar possíveis intervenções terapêuticas para o tratamento da DH porque mimetizam melhor a doença, apresentando diversas características que estão presentes na condição humana. Entre estas se destaca comportamentos similares ao comportamento depressivo humano e menor neurogênese hipocampal (SLOW *et al.*, 2003; VAN RAAMSDONK, MURPHY, *et al.*, 2005; BEGETI *et al.*, 2016).

Dentre os modelos genéticos existentes, o YAC128 é um modelo interessante por apresentar validade de face (os camundongos YAC128 mimetizam vários dos sintomas clínicos da DH, como por exemplo, déficits motores), constructo (os YAC128 apresentam características fisiopatológicas da DH, como por exemplo, morte neuronal estriatal), e validade preditiva (os YAC128 respondem ao tratamento clínico clássico para tratar os sintomas motores da DH) (LAST *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2010; YANG e GRAY, 2011). Além disso, os camundongos YAC128, de modo similar aos humanos, possuem diferenças na manifestação dos sintomas ao longo da vida (CROOK e HOUSMAN, 2011). A linhagem de camundongos YAC128 exibe anormalidades neuropatológicas e comportamentais similares as encontradas em pacientes com DH (SLOW *et al.*, 2003; VAN

RAAMSDONK, MURPHY, *et al.*, 2005; VAN RAAMSDONK, PEARSON, *et al.*, 2005) e apresenta comportamento tipo depressivo precocemente, nos estágios iniciais da progressão da doença (POULADI *et al.*, 2009).

A depressão é o transtorno psiquiátrico mais comum em pacientes portadores da DH, e muitas vezes se manifesta anos antes do surgimento dos sintomas motores (DUFF *et al.*, 2007; JULIEN *et al.*, 2007). Embora a etiologia da depressão na DH permaneça desconhecida, vários mecanismos patológicos têm sido propostos, incluindo a deficiência na sinalização de BDNF e neurotrofinas, e o prejuízo na neurogênese hipocampal (SIMPSON *et al.*, 2011; POULADI *et al.*, 2012; M'BAREK *et al.*, 2013). Em conformidade, foi verificada uma diminuição dos níveis de BDNF no estriado de pacientes com DH (FERRER *et al.*, 2000; ZUCCATO *et al.*, 2001) bem como em modelos animais (DUAN *et al.*, 2003; DUAN *et al.*, 2008).

Neste estudo utilizou-se de uma bateria de testes comportamentais para caracterizar o comportamento tipo-depressivo e anedônico em camundongos YAC128 no estágio inicial da DH (três meses de idade) e para testar a eficácia do tratamento repetido com BDNF i.n. em prevenir o aparecimento deste comportamento.

O primeiro parâmetro de comportamento analisado foi a anedonia que é definida como a perda da sensação de prazer ou a falta de reatividade a estímulos prazerosos, e é um dos principais sintomas da depressão (ASSOCIATION, 2000). Utilizou-se o TPS que é amplamente utilizado para testar a anedonia em roedores (PAPP *et al.*, 1991; WILLNER, 1997; GRØNLI *et al.*, 2005) e o teste da borrifagem da sacarose que foi desenvolvido como um teste de comportamento

motivacional, considerado equiparável a alguns sintomas do transtorno depressivo como o comportamento apático (WILLNER, 2005). A diminuição do comportamento anedônico/motivacional no teste da borrifagem da sacarose tem sido associada com a reatividade hedônica no teste de preferência pela sacarose e com aumento da imobilidade no TNF (POTHION *et al.*, 2004; GRIEBEL *et al.*, 2005).

Neste estudo os camundongos YAC128 apresentaram comportamento anedônico (diminuição significativa, abaixo de 65% no consumo de sacarose). Nosso resultado está de acordo com trabalhos anteriores que já tinham demonstrado a manifestação do comportamento anedônico nos YAC128 (POULADI *et al.*, 2009; RENOIR *et al.*, 2012). O tratamento i.n. com BDNF durante 15 dias reverteu a menor preferência pela sacarose. Este resultado está de acordo com outros estudos que demonstraram que medicamentos antidepressivos aumentam a preferência pela sacarose (TOWELL *et al.*, 1987; WILLNER *et al.*, 1987), e o aumento desta preferência já foi demonstrado através da infusão de BDNF por via i.c.v. (YE *et al.*, 2011) e pelo aumento da expressão de BDNF via recombinação gênica (MA *et al.*, 2016). Além disso, os camundongos YAC128 mostram diminuição no tempo total de autolimpeza no teste da borrifagem da sacarose, indicando a perda do comportamento motivacional (WILLNER, 2005). Este comportamento já foi observado em outros modelos animais para DH (ORVOEN *et al.*, 2012; QUESSEVEUR *et al.*, 2013).

O segundo parâmetro de comportamento tipo-depressivo analisado foi o “desespero comportamental” que é observado pela postura de desistência ou fracasso diante de uma situação inescapável (PORSOLT *et al.*, 1977; WILLNER, 1984; STERU *et al.*, 1985). Nos

testes TSC e TNF utilizados neste trabalho, o comportamento de imobilidade apresentado pelos camundongos quando expostos a uma situação de estresse inescapável, reflete um estado de desespero comportamental (PORSOLT *et al.*, 1977; WILLNER, 1984; STERU *et al.*, 1985), que pode ser relacionado à depressão em humanos. Animais com comportamento tipo-depressivo possuem latências menores e períodos maiores de imobilidade total, e este comportamento é revertido com substâncias com efeito antidepressivo (STERU *et al.*, 1985; PERRAULT *et al.*, 1992; VARTY *et al.*, 2003; PENG *et al.*, 2007). Os camundongos YAC128 apresentaram uma diminuição na latência para iniciar a imobilidade no TSC e no TNF. Além disso, os camundongos YAC128 apresentaram aumento no tempo de imobilidade e o tratamento com BDNF preveniu este aumento no TSC, sem afetar significativamente a atividade locomotora aos 3 meses de idade, conforme avaliado no campo aberto, indicando que os efeitos do BDNF sobre a imobilidade nestes testes não foram influenciados por alteração da atividade locomotora ou ansiedade. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores que demonstraram que os camundongos YAC128 apresentam comportamento tipo-depressivo no TNF (POULADI *et al.*, 2009; 2012).

Cabe destacar, em função dos resultados comportamentais encontrados no presente trabalho, que o BDNF é considerado um mediador crucial na eficácia clínica dos fármacos antidepressivos e ansiolíticos (WOO e LU, 2006). Vários trabalhos têm mostrado que níveis sorológicos de BDNF estão reduzidos em pacientes com transtorno depressivo e podem ser normalizados através de tratamento com antidepressivos (KAREGE *et al.*, 2005; MONTELEONE *et al.*,

2008; SEN *et al.*, 2008). Além disso, o declínio de BDNF no GD hipocampal tem mostrado induzir o comportamento tipo depressivo em roedores (TALIAZ *et al.*, 2010) e o tratamento antidepressivo com BDNF aumenta sua expressão tanto no hipocampo quanto na região mesolímbica dopaminérgica (MOLTENI *et al.*, 2006).

Surpreendentemente, apesar de atenuar o comportamento anedônico e tipo-depressivo, em camundongos YAC128 HD com três meses de idade, o tratamento com BDNF i.n. por 15 dias, não foi capaz de alterar os níveis de BDNF no estriado e no hipocampo desses animais transgênicos para DH. Em estudos anteriores os dados dos níveis basais de BDNF foram variáveis, não encontrando diferenças entre o grupo YAC128 e o selvagem (BETTIO *et al.*, 2016), ou encontrando, mas somente aos 16 meses de idade (SEO *et al.*, 2008; XIE *et al.*, 2010). Além disso, os resultados entre os animais tratados com BDNF e com salina também não foram diferentes, mostrando que apesar do BDNF alcançar o SNC através da via i.n. rapidamente (ALCALÁ-BARRAZA *et al.*, 2010), os níveis deste não se mantêm elevados por longos períodos (PAN *et al.*, 1998). Ainda que exista uma relação sólida entre os níveis séricos de BDNF e depressão, não está claro se os níveis séricos de BDNF refletem ou contribuem para níveis de BDNF no cérebro, particularmente no estriado e no hipocampo. O BDNF não atravessa a barreira hematoencefálica (PODUSLO e CURRAN, 1996; PAN *et al.*, 1998), embora o BDNF no plasma possa potencialmente influenciar os níveis desta neurotrofina em certas regiões cerebrais atravessando pontos onde barreira hematoencefálica é interrompida, como algumas partes do hipotálamo, glândula pituitária e glândula pineal. Por exemplo, a administração periférica de BDNF aumentou

significativamente os níveis de BDNF no estriado e no córtex de R6/2 HD, provavelmente por um efeito indireto, através de um aumento na síntese de BDNF cortical e estriatal (GIAMPÀ *et al.*, 2013).

Embora as razões para a ausência de efeito na administração i.n. de BDNF nos níveis estriatal e hipocampal desta neurotrofina sejam atualmente desconhecidas, é possível que o aumento nos níveis séricos de BDNF possa apenas afetar os níveis de BDNF cerebral quando estes estão comprometidos, o que não foi o caso no presente estudo (uma vez que não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de BDNF no estriado e no hipocampo entre os camundongos selvagem tratados com veículo e YAC128 com 3 meses de idade). Além disso, é possível que os resultados comportamentais observados do tratamento com BDNF não reflitam necessariamente alterações nos níveis de expressão desta neurotrofina numa região específica do cérebro, mas em vez disso altera o papel funcional desta neurotrofina dentro de uma determinada rede de neurônios. Assim, estudos futuros são necessários para determinar se 15 dias de administração i.n. de BDNF podem alterar as cascatas de sinalização mediadas por BDNF no estriado e/ou no hipocampo de camundongos YAC128 HD de 3 meses de idade.

Alterações na neurogênese hipocampal têm sido relatada em vários modelos transgênicos da DH (GIL *et al.*, 2004; LAZIC *et al.*, 2004; GIL *et al.*, 2005; PHILLIPS *et al.*, 2005; LAZIC *et al.*, 2006; KANDASAMY *et al.*, 2010; GIL-MOHAPEL e REGO, 2011; SIMPSON *et al.*, 2011) e alterações na capacidade neurogênica tem sido propostas como um fator importante na patologia da depressão. Inibidores da recaptção de serotonina são conhecidos por estimular a neurogênese hipocampal adulta (MALBERG *et al.*, 2000; MANEV *et*

al., 2001; CASTREN, 2004; BOLDRINI *et al.*, 2009; MARLATT *et al.*, 2010). Além de regular a sobrevivência neuronal (BARDE, 1989; GHOSH *et al.*, 2004) e promover plasticidade sináptica (MALBERG *et al.*, 2000; CASTREN, 2004), o BDNF também regula a neurogênese adulta (ZIGOVA *et al.*, 1998; SCHARFMAN *et al.*, 2005; HENRY *et al.*, 2007; BATH *et al.*, 2012). Portanto, neste estudo a proliferação celular e a diferenciação neuronal foi avaliada no GD de camundongos selvagens e YAC128 de 3 meses de idade. Nossos resultados mostram que embora o tratamento com BDNF aumente a proliferação celular e a maturação neuronal nos camundongos selvagens, esta neurotrofina não tem efeito nestes parâmetros nos animais YAC128.

É interessante notar que a maioria dos modelos transgênicos, incluindo os camundongos R6/1 (LAZIC *et al.*, 2004; LAZIC *et al.*, 2006; WALKER *et al.*, 2011), HdhQ111/Q111 (MOLERO *et al.*, 2009), e YAC128 (SIMPSON *et al.*, 2011), uma diminuição da proliferação celular é evidente somente quando os déficits motores são aparentes. Portanto, é possível que o tratamento com BDNF afete a neurogênese hipocampal em camundongos para a DH quando este processo esteja comprometido. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de que a falta do efeito do tratamento com BDNF na proliferação celular hipocampal e na diferenciação neuronal esteja relacionado com o fato que o regime de tratamento utilizado não alterou os níveis de BDNF hipocampais. Mais estudos são necessários para determinar se doses maiores de BDNF podem aumentar a neurogênese hipocampal em YAC128 nos estágios iniciais da DH. No entanto resultados similares foram relatados em estudos prévios que mostraram que camundongos fêmeas HdhQ111/Q111 desenvolvem comportamento do tipo-

depressivo sem alterar a neurogênese hipocampal adulta (ORVOEN *et al.*, 2012). Este resultado pode sugerir que em ambos os camundongos YAC128 e HdhQ111/Q111, a ocorrência de comportamento tipo-depressivo não é associada com uma diminuição da neurogênese hipocampal. Isto está de acordo com vários estudos que tem demonstrado que a capacidade neurogênica não é suficiente para desencadear a depressão (SANTARELLI *et al.*, 2003; BOLDRINI *et al.*, 2009; DAVID *et al.*, 2009).

Outro efeito conhecido do BDNF é a capacidade de promover a plasticidade cerebral através do aumento da ramificação dendrítica. Estes resultados estão de acordo com a literatura, onde o tratamento com BDNF via infusão por 24 horas foi capaz de aumentar a ramificação dendrítica (HORCH e KATZ, 2002) e animais transgênicos para aumento da expressão de BDNF possuíram naturalmente arborização dendrítica mais elevada na região CA3 do hipocampo (HORCH *et al.*, 1999; TOLWANI *et al.*, 2002). Alguns autores analisaram a arborização dendrítica nos YAC128 e similarmente aos resultados deste trabalho, não encontraram diferenças no genótipo quando analisaram estes animais no primeiro (MILNERWOOD *et al.*, 2010) e no terceiro (MADISON *et al.*, 2012) mês de vida, encontrando diferenças na arborização dendrítica somente a partir do quarto mês (MADISON *et al.*, 2012). Outra mensuração analisada foi o comprimento dendrítico e este parâmetro não foi alterado pelo genótipo ou pelo tratamento com BDNF. Este resultado não foi corroborado por trabalhos anteriores, onde foi demonstrado que animais transgênicos para a superexpressão de BDNF possuíram aumento no comprimento dendrítico de dendritos primários (HORCH e KATZ, 2002; TOLWANI *et al.*, 2002).

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a administração i.n. de BDNF por um período de 15 dias foi capaz de prevenir o comportamento anedônico e do tipo-depressivo em estágios iniciais da DH em camundongos YAC128 nos testes TPS, TBS, TSC e TNF. Estes benefícios comportamentais parecem não estar relacionados com um aumento dos níveis hipocâmpais ou estriatais de BDNF ou com a modulação da neurogênese hipocâmpal adulta. Estes resultados destacam o potencial terapêutico benéfico desta neurotrofina em prevenir os distúrbios do humor presentes nos estágios iniciais da DH.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar os efeitos da administração de BDNF i.n. no núcleo accumbens.
- Avaliar as mudanças de expressão gênica para os níveis de RNA mensageiro para BDNF e seu receptor decorrentes da administração de BDNF.
- Avaliar a ramificação dendrítica em camundongos YAC128 mais tardiamente e verificar se há diminuição desta devido ao genótipo.
- Utilizar um antagonista do receptor tirosina cinase B e comparar os resultados com o presente estudo.

9. REFERÊNCIAS

ALBIN, R. L. et al. Striatal and nigral neuron subpopulations in rigid Huntington's disease: Implications for the functional anatomy of chorea and rigidity- akinesia. **Annals of neurology**, v. 27, n. 4, p. 357-365, 1990.

ALCALÁ-BARRAZA, S. R. et al. Intranasal delivery of neurotrophic factors BDNF, CNTF, EPO, and NT-4 to the CNS. **Journal of drug targeting**, v. 18, n. 3, p. 179-190, 2010.

APOSTOL, B. L. et al. CEP-1347 reduces mutant huntingtin-associated neurotoxicity and restores BDNF levels in R6/2 mice. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 8-20, 2008.

ARREGUI, L. et al. Adenoviral astrocyte-specific expression of BDNF in the striata of mice transgenic for Huntington's disease delays the onset of the motor phenotype. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 31, n. 8, p. 1229-1243, 2011.

ASSOCIATION, A. P. **Diagnostic criteria from dsm-iv-tr**. American Psychiatric Pub, 2000.

BARDE, Y.-A. Trophic factors and neuronal survival. **Neuron**, v. 2, n. 6, p. 1525-1534, 1989.

BARDE, Y.-A.; EDGAR, D.; THOENEN, H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. **The EMBO journal**, v. 1, n. 5, p. 549, 1982.

BATH, K. G.; AKINS, M. R.; LEE, F. S. BDNF control of adult SVZ neurogenesis. **Developmental psychobiology**, v. 54, n. 6, p. 578-589, 2012.

BAYDYUK, M.; XU, B. BDNF signaling and survival of striatal neurons. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 8, p. 254, 2014.

BBIOMEDSC, L. F. B. Short-term social isolation induces depressive-like behaviour and reinstates the retrieval of an aversive task: Mood-congruent memory in male mice? **Journal of psychiatry & neuroscience: JPN**, v. 38, n. 4, p. 259, 2013.

BEGETI, F. et al. Hippocampal dysfunction defines disease onset in Huntington's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, p. jnnp-2015-312413, 2016.

BEHRENS, P. et al. Impaired glutamate transport and glutamate–glutamine cycling: downstream effects of the Huntington mutation. **Brain**, v. 125, n. 8, p. 1908-1922, 2002.

BEMELMANS, A.-P. et al. Brain-derived neurotrophic factor-mediated protection of striatal neurons in an excitotoxic rat model of Huntington's disease, as demonstrated by adenoviral gene transfer. **Human gene therapy**, v. 10, n. 18, p. 2987-2997, 1999.

BERNHEIMER, H. et al. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington Clinical, morphological and neurochemical correlations. **Journal of the neurological sciences**, v. 20, n. 4, p. 415-455, 1973.

BETTIO, L. E.; BROCARDO, P. S.; MCGINNIS, E. Alterations in Striatal Survival Signaling Pathways in the YAC128 Transgenic Mouse Model of Huntington's Disease. **Ann Neurodegener Dis**, v. 1, n. 3, p. 1012, 2016.

BLOCK, F.; KUNKEL, M.; SCHWARZ, M. Quinolinic acid lesion of the striatum induces impairment in spatial learning and motor performance in rats. **Neuroscience letters**, v. 149, n. 2, p. 126-128, 1993.

BOLDRINI, M. et al. Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 11, p. 2376-2389, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRANDT, J. et al. Clinical correlates of dementia and disability in Huntington's disease. **Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology**, v. 6, n. 4, p. 401-412, 1984.

BROWN, J. P. et al. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. **J Comp Neurol**, v. 467, n. 1, p. 1-10, Dec 1 2003.

BURKE, M. A. et al. Loss of developing cholinergic basal forebrain neurons following excitotoxic lesions of the hippocampus: rescue by neurotrophins. **Experimental neurology**, v. 130, n. 2, p. 178-195, 1994.

CAN, A. et al. The mouse forced swim test. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 59, p. e3638-e3638, 2012.

CAO, S.-L.; ZHANG, Q.-Z.; JIANG, X.-G. Preparation of ion-activated in situ gel systems of scopolamine hydrobromide and evaluation of its antimotion sickness efficacy. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 28, n. 4, p. 584, 2007

CASTAGNÉ, V. et al. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. **Curr Protoc Neurosci**, v. 55, n. 8.10, p. 1-8.10, 2011.

CASTREN, E. Neurotrophic effects of antidepressant drugs. **Current opinion in pharmacology**, v. 4, n. 1, p. 58-64, 2004.

CAVISTON, J. P.; HOLZBAUR, E. L. Huntingtin as an essential integrator of intracellular vesicular trafficking. **Trends in cell biology**, v. 19, n. 4, p. 147-155, 2009.

CHANG, D. T. et al. Mutant huntingtin aggregates impair mitochondrial movement and trafficking in cortical neurons. **Neurobiology of disease**, v. 22, n. 2, p. 388-400, 2006.

CHIU, K. et al. Micro-dissection of rat brain for RNA or protein extraction from specific brain region. 2007.

CIAMEI, A.; MORTON, A. J. Rigidity in social and emotional memory in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. **Neurobiology of learning and memory**, v. 89, n. 4, p. 533-544, 2008.

CIAMMOLA, A. et al. Low brain- derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of Huntington's disease patients. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 144, n. 4, p. 574-577, 2007.

COLLINGRIDGE, G. L. et al. Long-term depression in the CNS. **Nature reviews neuroscience**, v. 11, n. 7, p. 459-473, 2010.

CONNELLY, P. M. Huntington disease: genetics and epidemiology. **American journal of human genetics**, v. 36, n. 3, p. 506, 1984.

CONNOR, B.; DRAGUNOW, M. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. **Brain Research Reviews**, v. 27, n. 1, p. 1-39, 1998.

COUILLARD-DESPRES, S. et al. Molecular mechanisms of neuronal migration disorders, quo vadis? **Curr Mol Med**, v. 1, n. 6, p. 677-88, Dec 2001.

COUILLARD-DESPRES, S. et al. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. **Eur J Neurosci**, v. 21, n. 1, p. 1-14, Jan 2005.

COYLE, J. T.; SCHWARCZ, R. Lesion of striatal neurons with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. **Nature**, v. 263, p. 244-246, 1976a.

Lesion of striatal neurons with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. 1976b.

CRITCHLEY, M. The history of Huntington's chorea. **Psychological medicine**, v. 14, n. 04, p. 725-727, 1984.

CROOK, Z. R.; HOUSMAN, D. Huntington's disease: can mice lead the way to treatment? **Neuron**, v. 69, n. 3, p. 423-435, 2011.

DAVID, D. J. et al. Neurogenesis-dependent and-independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. **Neuron**, v. 62, n. 4, p. 479-493, 2009.

DEIERBORG, T. et al. Emerging restorative treatments for Parkinson's disease. **Progress in neurobiology**, v. 85, n. 4, p. 407-432, 2008.

DEY, N. D. et al. Genetically engineered mesenchymal stem cells reduce behavioral deficits in the YAC 128 mouse model of Huntington's disease. **Behavioural brain research**, v. 214, n. 2, p. 193-200, 2010.

DIETRICH, P. et al. Congenital hydrocephalus associated with abnormal subcommissural organ in mice lacking huntingtin in Wnt1 cell lineages. **Hum Mol Genet**, v. 18, n. 1, p. 142-50, Jan 01 2009.

DIFIGLIA, M. et al. Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. **Neuron**, v. 14, n. 5, p. 1075-1081, 1995.

DIVINO, V. et al. The direct medical costs of Huntington's disease by stage. A retrospective commercial and Medicaid claims data analysis. **Journal of medical economics**, v. 16, n. 8, p. 1043-1050, 2013.

DRAGUNOW, M. et al. In situ evidence for DNA fragmentation in Huntington's disease striatum and Alzheimer's disease temporal lobes. **Neuroreport**, v. 6, n. 7, p. 1053-1057, 1995.

DUAN, W. et al. Dietary restriction normalizes glucose metabolism and BDNF levels, slows disease progression, and increases survival in huntingtin mutant mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 5, p. 2911-2916, 2003.

DUAN, W. et al. Sertraline slows disease progression and increases neurogenesis in N171-82Q mouse model of Huntington's disease. **Neurobiology of disease**, v. 30, n. 3, p. 312-322, 2008.

DUCOTTET, C.; AUBERT, A.; BELZUNG, C. Susceptibility to subchronic unpredictable stress is related to individual reactivity to threat stimuli in mice. **Behavioural brain research**, v. 155, n. 2, p. 291-299, 2004.

DUFF, K. et al. Psychiatric symptoms in Huntington's disease before diagnosis: the predict-HD study. **Biological psychiatry**, v. 62, n. 12, p. 1341-1346, 2007.

DUYAO, M. et al. Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. **Nature genetics**, v. 4, n. 4, p. 387-392, 1993.

DUYAO, M. P. et al. Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. **Science**, v. 269, n. 5222, p. 407-10, Jul 21 1995.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 871-874, 1971.

EVANS, S. J. et al. Prevalence of adult Huntington's disease in the UK based on diagnoses recorded in general practice records. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, p. jnnp-2012-304636, 2013.

FEDELE, V. et al. Neurogenesis in the R6/2 mouse model of Huntington's disease is impaired at the level of NeuroD1. **Neuroscience**, v. 173, p. 76-81, 2011.

FENNEMA-NOTESTINE, C. et al. In vivo evidence of cerebellar atrophy and cerebral white matter loss in Huntington disease. **Neurology**, v. 63, n. 6, p. 989-995, 2004.

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

FOLSTEIN, S. E. et al. Huntington disease in Maryland: clinical aspects of racial variation. **American journal of human genetics**, v. 41, n. 2, p. 168, 1987.

GAUTHIER, L. 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.

GHOSH, J.; KUIPERS, B. J.; MOONEY, R. J. Efficient evolution of neural networks through complexification. 2004.

GIAMPÀ, C. et al. Systemic delivery of recombinant brain derived neurotrophic factor (BDNF) in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64037, 2013. ISS

GIBSON, H. E. et al. A similar impairment in CA3 mossy fibre LTP in the R6/2 mouse model of Huntington's disease and in the complexin II knockout mouse. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 7, p. 1701-1712, 2005.

GIL-MOHAPEL, J. 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.

GIL-MOHAPEL, J. M.; REGO, A. C. Doença de Huntington: Uma revisão dos aspectos fisiopatológicos. **Rev Ncienc**, v. 19, n. 4, p. 724-734, 2011.

GIL, J. M. et al. Asialoerythropoetin is not effective in the R6/2 line of Huntington's disease mice. **BMC neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 17, 2004.

GIL, J. M. et al. Reduced hippocampal neurogenesis in R6/2 transgenic Huntington's disease mice. **Neurobiology of disease**, v. 20, n. 3, p. 744-751, 2005.

GILL, S. S. et al. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. **Nature medicine**, v. 9, n. 5, p. 589-595, 2003.

GIRALT, A. et al. Conditional BDNF release under pathological conditions improves Huntington's disease pathology by delaying neuronal dysfunction. **Molecular neurodegeneration**, v. 6, n. 1, p. 71, 2011.

GLEESON, J. G. et al. Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. **Cell**, v. 92, n. 1, p. 63-72, Jan 9 1998.

GRAVELAND, G.; WILLIAMS, R.; DIFIGLIA, M. Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. **Science**, v. 227, n. 4688, p. 770-773, 1985.

GRAY, M. et al. Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 24, p. 6182-6195, 2008.

GRIEBEL, G.; STEMMELIN, J.; SCATTON, B. Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant in models of emotional reactivity in rodents. **Biological psychiatry**, v. 57, n. 3, p. 261-267, 2005.

GRØNLI, J. et al. Effects of chronic mild stress on sexual behavior, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions. **Physiology & behavior**, v. 84, n. 4, p. 571-577, 2005.

GROTE, H. E. et al. Cognitive disorders and neurogenesis deficits in Huntington's disease mice are rescued by fluoxetine. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 8, p. 2081-2088, 2005.

HEDREEN, J. C. et al. Neuronal loss in layers V and VI of cerebral cortex in Huntington's disease. **Neuroscience letters**, v. 133, n. 2, p. 257-261, 1991.

HENRY, R. A.; HUGHES, S. M.; CONNOR, B. AAV- mediated delivery of BDNF augments neurogenesis in the normal and quinolinic acid- lesioned adult rat brain. **European Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 12, p. 3513-3525, 2007.

HODGSON, J. G. 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.

HOFSTETTER, J. R. et al. Genomic DNA from mice: a comparison of recovery methods and tissue sources. **Biochemical and molecular medicine**, v. 62, n. 2, p. 197-202, 1997.

HORCH, H. W.; KATZ, L. C. BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. **Nature neuroscience**, v. 5, n. 11, p. 1177-1184, 2002.

HORCH, H. W. et al. Destabilization of cortical dendrites and spines by BDNF. **Neuron**, v. 23, n. 2, p. 353-364, 1999.

HUNTINGTON, G. Medical and Surgical Reporter. **On Chorea**, p. 320-321, 1872.

ISLAM, O.; LOO, T. X.; HEESE, K. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has proliferative effects on neural stem cells through the

truncated TRK-B receptor, MAP kinase, AKT, and STAT-3 signaling pathways. **Current neurovascular research**, v. 6, n. 1, p. 42-53, 2009.

JASON, G. W. et al. Presymptomatic neuropsychological impairment in Huntington's disease. **Archives of Neurology**, v. 45, n. 7, p. 769-773, 1988.

JESTE, D. V.; BARBAN, L.; PARISI, J. Reduced Purkinje cell density in Huntington's disease. **Experimental neurology**, v. 85, n. 1, p. 78-86, 1984.

JONES, C. et al. The societal cost of Huntington's disease: are we underestimating the burden? **European journal of neurology**, v. 23, n. 10, p. 1588-1590, 2016.

JULIEN, C. L. et al. Psychiatric disorders in preclinical Huntington's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 78, n. 9, p. 939-943, 2007.

KALUEFF, A. Grooming and stress. **M: Avix**, 2002.

KALUEFF, A. V.; TUOHIMAA, P. Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. **Brain Research Protocols**, v. 13, n. 3, p. 151-158, 2004.

KANDASAMY, M. et al. Stem cell quiescence in the hippocampal neurogenic niche is associated with elevated transforming growth factor- β signaling in an animal model of huntington disease. **Journal of**

Neuropathology & Experimental Neurology, v. 69, n. 7, p. 717-728, 2010.

KAREGE, F. et al. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. **Biological psychiatry**, v. 57, n. 9, p. 1068-1072, 2005.

KELLS, A. P. et al. AAV-mediated gene delivery of BDNF or GDNF is neuroprotective in a model of Huntington disease. **Molecular Therapy**, v. 9, n. 5, p. 682-688, 2004.

KUHN, A. et al. Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. **Human molecular genetics**, v. 16, n. 15, p. 1845-1861, 2007.

LAST, J. M. et al. **A dictionary of epidemiology**. International Epidemiological Association, Inc., 2001.

LAWRENCE, A. D. et al. Evidence for specific cognitive deficits in preclinical Huntington's disease. **Brain**, v. 121, n. 7, p. 1329-1341, 1998.

LAZIC, S. E.; BARKER, R. A. Cell-based therapies for disorders of the CNS. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 15, n. 10, p. 1361-1376, 2005..

LAZIC, S. E. et al. Decreased hippocampal cell proliferation in R6/1 Huntington's mice. **Neuroreport**, v. 15, n. 5, p. 811-813, 2004.

LAZIC, S. E. et al. Neurogenesis in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease: effects of environmental enrichment. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 7, p. 1829-1838, 2006.

LEE, W. et al. Enhanced Ca²⁺-dependent glutamate release from astrocytes of the BACHD Huntington's disease mouse model. **Neurobiology of disease**, v. 58, p. 192-199, 2013.

LEUNER, B.; GOULD, E. Structural plasticity and hippocampal function. **Annual review of psychology**, v. 61, p. 111-140, 2010.

LI, H. et al. Amino-terminal fragments of mutant huntingtin show selective accumulation in striatal neurons and synaptic toxicity. **Nature genetics**, v. 25, n. 4, p. 385-389, 2000.

LI, L. et al. Real-time imaging of Huntingtin aggregates diverting target search and gene transcription. **eLife**, v. 5, p. e17056, 2016.

LI, S.-H. et al. Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n. 5, p. 1277-1287, 2002.

M'BAREK, K. B. et al. Huntingtin mediates anxiety/depression-related behaviors and hippocampal neurogenesis. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 20, p. 8608-8620, 2013.

MA, X.-C. et al. Intranasal delivery of recombinant AAV containing BDNF fused with HA2TAT: a potential promising therapy strategy for major depressive disorder. **Scientific reports**, v. 6, p. 22404, 2016.

MACDONALD, M. 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.

MADISON, J. L. et al. Disease-toxicant interactions in manganese exposed Huntington disease mice: early changes in striatal neuron morphology and dopamine metabolism. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31024, 2012.

MAISONPIERRE, P. C. et al. NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. **Neuron**, v. 5, n. 4, p. 501-509, 1990.

MAJITHIYA, R. J. et al. Thermoreversible-mucoadhesive gel for nasal delivery of sumatriptan. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 3, p. E80-E86, 2006.

MALBERG, J. E. et al. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 24, p. 9104-9110, 2000.

MANEV, H. et al. Neurogenesis and Neuroprotection in the Adult Brain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 939, n. 1, p. 45-51, 2001.

MANGIARINI, L. 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.

MARLATT, M. W.; LUCASSEN, P. J.; VAN PRAAG, H. Comparison of neurogenic effects of fluoxetine, duloxetine and running in mice. **Brain research**, v. 1341, p. 93-99, 2010.

MARTIN, J. B.; GUSELLA, J. F. Huntingtons disease. **New England Journal of Medicine**, v. 315, n. 20, p. 1267-1276, 1986.

MAURAGE, P. et al. Dissociating emotional and cognitive empathy in pre-clinical and clinical Huntington's disease. **Psychiatry research**, v. 237, p. 103-108, 2016.

MENALLED, L. B. et al. Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. **Journal of Comparative Neurology**, v. 465, n. 1, p. 11-26, 2003.

MILAKOVIC, T.; JOHNSON, G. V. Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 35, p. 30773-30782, 2005.

MILNERWOOD, A. J. et al. Early increase in extrasynaptic NMDA receptor signaling and expression contributes to phenotype onset in Huntington's disease mice. **Neuron**, v. 65, n. 2, p. 178-190, 2010.

MOLERO, A. E. et al. Impairment of developmental stem cell-mediated striatal neurogenesis and pluripotency genes in a knock-in model of Huntington's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 51, p. 21900-21905, 2009.

MOLTENI, R. et al. Chronic treatment with fluoxetine up-regulates cellular BDNF mRNA expression in rat dopaminergic regions. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 9, n. 3, p. 307-317, 2006.

MONTELEONE, P. et al. Decreased levels of serum brain-derived neurotrophic factor in both depressed and euthymic patients with unipolar depression and in euthymic patients with bipolar I and II disorders. **Bipolar disorders**, v. 10, n. 1, p. 95-100, 2008.

MURPHY, K. P. et al. Abnormal synaptic plasticity and impaired spatial cognition in mice transgenic for exon 1 of the human Huntington's disease mutation. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 13, p. 5115-5123, 2000.

OLSON, S. D. et al. Genetically engineered mesenchymal stem cells as a proposed therapeutic for Huntington's disease. **Molecular neurobiology**, v. 45, n. 1, p. 87-98, 2012.

ORVOEN, S. et al. Huntington's disease knock-in male mice show specific anxiety-like behaviour and altered neuronal maturation. **Neuroscience letters**, v. 507, n. 2, p. 127-132, 2012.

PAN, W. et al. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. **Neuropharmacology**, v. 37, n. 12, p. 1553-1561, 1998.

PANG, T. et al. Differential effects of voluntary physical exercise on behavioral and brain-derived neurotrophic factor expression deficits in Huntington's disease transgenic mice. **Neuroscience**, v. 141, n. 2, p. 569-584, 2006.

PANG, T. Y. et al. Altered serotonin receptor expression is associated with depression-related behavior in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease. **Human molecular genetics**, v. 18, n. 4, p. 753-766, 2009.

PAPP, M.; WILLNER, P.; MUSCAT, R. An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. **Psychopharmacology**, v. 104, n. 2, p. 255-259, 1991.

PAULSEN, J. S. et al. Neuropsychiatric aspects of Huntington's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 71, n. 3, p. 310-314, 2001.

PENG, Q. et al. The antidepressant sertraline improves the phenotype, promotes neurogenesis and increases BDNF levels in the R6/2 Huntington's disease mouse model. **Experimental neurology**, v. 210, n. 1, p. 154-163, 2008.

PENG, W.-H. et al. Berberine produces antidepressant-like effects in the forced swim test and in the tail suspension test in mice. **Life sciences**, v. 81, n. 11, p. 933-938, 2007.

PERRAULT, G. et al. Activity of litoxetine and other serotonin uptake inhibitors in the tail suspension test in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 42, n. 1, p. 45-47, 1992.

PHILLIPS, W.; MORTON, A. J.; BARKER, R. A. Abnormalities of neurogenesis in the R6/2 mouse model of Huntington's disease are attributable to the in vivo microenvironment. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 50, p. 11564-11576, 2005.

PODUSLO, J. F.; CURRAN, G. L. Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. **Molecular Brain Research**, v. 36, n. 2, p. 280-286, 1996.

PORSOLT, R.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie**, v. 229, n. 2, p. 327-336, 1977.

POTHION, S. et al. Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. **Behavioural brain research**, v. 155, n. 1, p. 135-146, 2004.

POULADI, M. A. et al. NP03, a novel low-dose lithium formulation, is neuroprotective in the YAC128 mouse model of Huntington disease. **Neurobiology of disease**, v. 48, n. 3, p. 282-289, 2012.

POULADI, M. 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.

QUESSEVEUR, G. et al. BDNF overexpression in mouse hippocampal astrocytes promotes local neurogenesis and elicits anxiolytic-like activities. **Translational psychiatry**, v. 3, n. 4, p. e253, 2013.

RASBAND, W. **ImageJ, USNIH, Bethesda, Maryland, USA** 2016.

RAVIKUMAR, B. et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. **Nature genetics**, v. 36, n. 6, p. 585-595, 2004.

RENOIR, T. et al. Treatment of depressive- like behaviour in Huntington's disease mice by chronic sertraline and exercise. **British journal of pharmacology**, v. 165, n. 5, p. 1375-1389, 2012.

RIGHI, S. et al. Time perception impairment in early-to-moderate stages of Huntington's disease is related to memory deficits. **Neurological Sciences**, v. 37, n. 1, p. 97-104, 2016.

RODDA, R. Cerebellar atrophy in Huntington's disease. **Journal of the neurological sciences**, v. 50, n. 1, p. 147-157, 1981.

ROOS, R. A. Huntington's disease: a clinical review. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 5, n. 1, p. 1, 2010a.

_____. Huntington's disease: a clinical review. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 5, n. 1, p. 40, 2010b.

ROSAS, H. et al. Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD An MRI-based morphometric analysis. **Neurology**, v. 60, n. 10, p. 1615-1620, 2003.

ROSAS, H. et al. Regional and progressive thinning of the cortical ribbon in Huntington's disease. **Neurology**, v. 58, n. 5, p. 695-701, 2002.

RUBINSZTEIN, D. C. et al. Phenotypic characterization of individuals with 30–40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36–39 repeats. **American journal of human genetics**, v. 59, n. 1, p. 16, 1996.

RUIZ, P. J. G. et al. Bradykinesia in Huntington's disease. **Clinical neuropharmacology**, v. 23, n. 1, p. 50-52, 2000.

SAKANE, T.; PARDRIDGE, W. M. Carboxyl-directed pegylation of brain-derived neurotrophic factor markedly reduces systemic clearance with minimal loss of biologic activity. **Pharmaceutical research**, v. 14, n. 8, p. 1085-1091, 1997.

SANCHEZ-PERNAUTE, R. et al. Bradykinesia in early Huntington's disease. **Neurology**, v. 54, n. 1, p. 119-119, 2000.

SANTARELLI, L. et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **science**, v. 301, n. 5634, p. 805-809, 2003.

SCHARFMAN, H. et al. Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. **Experimental neurology**, v. 192, n. 2, p. 348-356, 2005.

SCHERZINGER, E. et al. Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: implications for Huntington's disease pathology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 8, p. 4604-4609, 1999.

SCHILLING, G. et al. Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. **Human molecular genetics**, v. 8, n. 3, p. 397-407, 1999.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **J Cell Physiol**, v. 182, n. 3, p. 311-22, Mar 2000.

SEN, S.; DUMAN, R.; SANACORA, G. Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. **Biological psychiatry**, v. 64, n. 6, p. 527-532, 2008.

SEO, H.; KIM, W.; ISACSON, O. Compensatory changes in the ubiquitin-proteasome system, BDNF and mitochondrial complex II/III in YAC72 and R6/2 transgenic mice partially model Huntington's disease (HD) patients. **Human Molecular Genetics**, 2008.

SEO, H.; SONNTAG, K. C.; ISACSON, O. Generalized brain and skin proteasome inhibition in Huntington's disease. **Annals of neurology**, v. 56, n. 3, p. 319-328, 2004.

SHIEH, C.-H. et al. Potential antidepressant properties of cysteamine on hippocampal BDNF levels and behavioral despair in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 32, n. 6, p. 1590-1594, 2008.

SHOULSON, I.; FAHN, S. Huntington disease clinical care and evaluation. **Neurology**, v. 29, n. 1, p. 1-1, 1979.

SIMMONS, D. A. et al. Up-regulating BDNF with an ampakine rescues synaptic plasticity and memory in Huntington's disease knockin mice.

Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 106, n. 12, p. 4906-4911, 2009.

SIMPSON, J. M. et al. Altered adult hippocampal neurogenesis in the YAC128 transgenic mouse model of Huntington disease. **Neurobiology of disease**, v. 41, n. 2, p. 249-260, 2011.

SLOW, E. J. et al. Absence of behavioral abnormalities and neurodegeneration in vivo despite widespread neuronal huntingtin inclusions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 32, p. 11402-11407, 2005.

SLOW, E. 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.

SPARGO, E.; EVERALL, I.; LANTOS, P. Neuronal loss in the hippocampus in Huntington's disease: a comparison with HIV infection. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 56, n. 5, p. 487-491, 1993.

SPIRES, T. L. et al. Dendritic spine pathology and deficits in experience-dependent dendritic plasticity in R6/1 Huntington's disease transgenic mice. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 10, p. 2799-2807, 2004.

SPIRES, T. L. et al. Environmental enrichment rescues protein deficits in a mouse model of Huntington's disease, indicating a possible disease mechanism. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 9, p. 2270-2276, 2004.

SQUIRE, L. R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. **Psychological review**, v. 99, n. 2, p. 195, 1992.

STERU, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367-370, 1985.

STOUT, J. C. et al. Neurocognitive signs in prodromal Huntington disease. **Neuropsychology**, v. 25, n. 1, p. 1, 2011.

SUGARS, K. L. et al. Decreased cAMP Response Element-mediated Transcription AN EARLY EVENT IN EXON 1 AND FULL-LENGTH CELL MODELS OF HUNTINGTON' S DISEASE THAT CONTRIBUTES TO POLYGLUTAMINE PATHOGENESIS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 6, p. 4988-4999, 2004.

TALEGAONKAR, S.; MISHRA, P. Intranasal delivery: An approach to bypass the blood brain barrier. **Indian journal of pharmacology**, v. 36, n. 3, p. 140, 2004.

TALIAZ, D. et al. Knockdown of brain-derived neurotrophic factor in specific brain sites precipitates behaviors associated with depression and reduces neurogenesis. **Molecular psychiatry**, v. 15, n. 1, p. 80-92, 2010.

THOENEN, H.; SENDTNER, M. Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. **Nature neuroscience**, v. 5, p. 1046-1050, 2002.

THOMPSON, P. et al. The coexistence of bradykinesia and chorea in Huntington's disease and its implications for theories of basal ganglia control of movement. **Brain**, v. 111, n. 2, p. 223-244, 1988.

TOLWANI, R. et al. BDNF overexpression increases dendrite complexity in hippocampal dentate gyrus. **Neuroscience**, v. 114, n. 3, p. 795-805, 2002.

TOWELL, A.; MUSCAT, R.; WILLNER, P. Effects of pimozide on sucrose consumption and preference. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 262-264, 1987.

USDIN, M. T. et al. Impaired synaptic plasticity in mice carrying the Huntington's disease mutation. **Human molecular genetics**, v. 8, n. 5, p. 839-846, 1999.

VAKA, S. R. K. et al. Delivery of brain-derived neurotrophic factor via nose-to-brain pathway. **Pharmaceutical research**, v. 29, n. 2, p. 441-447, 2012.

VAN RAAMSDONK, J. M. et al. Phenotypic abnormalities in the YAC128 mouse model of Huntington disease are penetrant on multiple genetic backgrounds and modulated by strain. **Neurobiology of disease**, v. 26, n. 1, p. 189-200, 2007.

VAN RAAMSDONK, J. 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, J. M. et al. Cognitive dysfunction precedes neuropathology and motor abnormalities in the YAC128 mouse model of Huntington's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 16, p. 4169-4180, 2005.

VARSHOSAZ, J.; SADRAI, H.; HEIDARI, A. Nasal delivery of insulin using bioadhesive chitosan gels. **Drug delivery**, v. 13, n. 1, p. 31-38, 2006.

VARTY, G.; COHEN-WILLIAMS, M.; HUNTER, J. The antidepressant-like effects of neurokinin NK1 receptor antagonists in a gerbil tail suspension test. **Behavioural pharmacology**, v. 14, n. 1, p. 87-95, 2003.

WALKER, A. G.; UMMEL, J. R.; REBEC, G. V. Reduced expression of conditioned fear in the R6/2 mouse model of Huntington's disease is related to abnormal activity in prefrontal cortex. **Neurobiology of disease**, v. 43, n. 2, p. 379-387, 2011.

WANG, H. et al. Tetraabenazine is neuroprotective in Huntington's disease mice. **Molecular neurodegeneration**, v. 5, n. 1, p. 18, 2010.

WERMELING, D.; MILLER, J.; RUDY, A. Systematic intranasal drug delivery: Concepts and applications. **Drug Deliv Technol**, v. 2, p. 56-62, 2002.

WEYDT, P. et al. Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1 α in Huntington's disease neurodegeneration. **Cell metabolism**, v. 4, n. 5, p. 349-362, 2006.

WHEELER, V. C. et al. Long glutamine tracts cause nuclear localization of a novel form of huntingtin in medium spiny striatal neurons in HdhQ92 and HdhQ111 knock-in mice. **Human molecular genetics**, v. 9, n. 4, p. 503-513, 2000.

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**, v. 83, n. 1, p. 1-16, 1984.

Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology**, v. 134, n. 4, p. 319-329, 1997.

Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 2, p. 90-110, 2005.

WILLNER, P. et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, v. 93, n. 3, p. 358-364, 1987.

WOO, N. H.; LU, B. Regulation of cortical interneurons by neurotrophins: from development to cognitive disorders. **The Neuroscientist**, v. 12, n. 1, p. 43-56, 2006.

WYTTENBACH, A. et al. Polyglutamine expansions cause decreased CRE-mediated transcription and early gene expression changes prior to cell death in an inducible cell model of Huntington's disease. **Human molecular genetics**, v. 10, n. 17, p. 1829-1845, 2001.

XIE, Y.; HAYDEN, M. R.; XU, B. BDNF overexpression in the forebrain rescues Huntington's disease phenotypes in YAC128 mice. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 44, p. 14708-14718, 2010.

YALCIN, I.; AKSU, F.; BELZUNG, C. Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. **European journal of pharmacology**, v. 514, n. 2, p. 165-174, 2005.

YAMADA, K. et al. Nose-to-brain delivery of TS-002, prostaglandin D2 analogue. **Journal of drug targeting**, v. 15, n. 1, p. 59-66, 2007.

YANG, X. W.; GRAY, M. Mouse models for validating preclinical candidates for Huntington's disease. **Neurobiology of Huntington's Disease: Applications to Drug Discovery**, p. 165-195, 2011.

YE, Y. et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) infusion restored astrocytic plasticity in the hippocampus of a rat model of depression. **Neuroscience letters**, v. 503, n. 1, p. 15-19, 2011.

ZHOU, H.; LI, S.-H.; LI, X.-J. Chaperone suppression of cellular toxicity of huntingtin is independent of polyglutamine aggregation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 51, p. 48417-48424, 2001.

ZIGOVA, T. et al. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 11, n. 4, p. 234-245, 1998.

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

ZUCCATO, C. et al. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. **Science**, v. 293, n. 5529, p. 493-498, 2001.

ZUCCATO, C. et al. Progressive loss of BDNF in a mouse model of Huntington's disease and rescue by BDNF delivery. **Pharmacological research**, v. 52, n. 2, p. 133-139, 2005.

ZUCCATO, C. et al. Systematic assessment of BDNF and its receptor levels in human cortices affected by Huntington's disease. **Brain pathology**, v. 18, n. 2, p. 225-238, 2008.