

Evelini Plácido

**EFEITOS DO AMBIENTE ENRIQUECIDO NA  
NEUROPLASTICIDADE HIPOCAMPAL NO MODELO  
ANIMAL YAC128 DA DOENÇA DE HUNTINGTON**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-  
Graduação em Neurociências da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
para a obtenção do Grau de Mestre em  
Neurociências  
Orientadora: Profa. Dra. Patricia de Souza  
Brocardo

Florianópolis  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Plácido, Evelini

Efeitos do ambiente enriquecido na  
neuroplasticidade hipocampal no modelo animal  
YAC128 da doença de Huntington / Evelini Plácido ;  
orientadora, Patricia de Souza Brocardo, 2018.  
97 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,  
Programa de Pós-Graduação em Neurociências,  
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

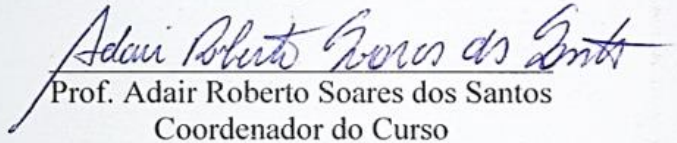
1. Neurociências. 2. Neuroplasticidade. 3. Doença  
de Huntington. 4. Hipocampo. 5. Neurogênese. I.  
Brocardo, Patricia de Souza. II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação  
em Neurociências. III. Título.

EVELINI PLACIDO

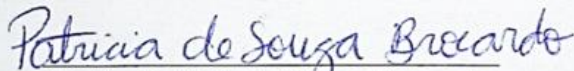
**“EFEITOS DO AMBIENTE ENRIQUECIDO NA  
NEUROPLASTICIDADE HIPOCAMPAL NO MODELO  
ANIMAL YAC128 DA DOENÇA DE HUNTINGTON”**

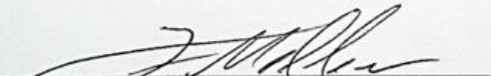
Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

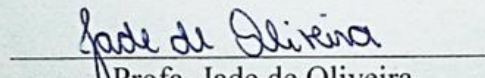
Florianópolis, 23 de fevereiro de 2018.

  
Prof. Adair Roberto Soares dos Santos  
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

  
Prof. Patrícia de Souza Brocardo  
Orientadora – UFSC

  
Prof. Fernando Falkenburger Melleu  
Membro externo

  
Prof. Jade de Oliveira  
Membro externo



Este trabalho é dedicado à ciência e à  
todas as pessoas para quem ele for útil.



## AGRADECIMENTOS

Na caminhada até aqui as coisas aconteceram no momento certo, mas sem as pessoas certas eu nem conseguiria caminhar, por isso gostaria de agradecer:

À minha orientadora Professora Doutora Patricia de Souza Brocardo por ter me dado a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa. Agradeço pelo acolhimento, pelos ensinamentos, pela dedicação, pelos incentivos, pela paciência e confiança em mim depositada, por sua maneira gentil e profissional de lidar com tudo.

À minha família, minha mãe Lourdes Plácido, meu pai Manoel Ferreira Plácido e meu irmão Elivelto Plácido por terem sempre me incentivado a estudar e apoiado as minhas escolhas, me ouvindo, dando suporte e torcendo por mim.

Ao meu amado Lucimar Sávio Sapelli, namorado, marido, companheiro por estar ao meu lado nos momentos bons e ruins, me apoiando, me animando e me dando forças para eu conseguir alcançar meus objetivos com muito amor, carinho e um pouquinho de paciência.

Aos colegas do Laboratório de Neuroplasticidade, LANEP: Ana, Claudia, Cristine, Fabiani, Kátia e Victor pelos ensinamentos, discussões científicas ou não, pelo auxílio nos experimentos, pela companhia e apoio contínuo compartilhado.

Aos Professores do curso de Pós-Graduação em Neurociências, de outros cursos e de fora da universidade pelos conhecimentos e exemplos passados durante as aulas.

Aos colegas de disciplinas pela tensão e conhecimento compartilhados.

Aos colegas e técnicos dos demais laboratórios que contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho.

A todos os colaboradores, familiares e amigos, que direta ou indiretamente participaram nesta fase da minha vida, meu muito obrigado.

Aos animais experimentais utilizados neste trabalho, minha gratidão e respeito.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro e à UFSC pelo espaço físico e organização disponibilizados.





Adquirir conhecimento é importante, mas manter a capacidade de adquirir novos conhecimentos e manter a plasticidade é ainda mais.  
(Evelini Plácido, 2018)



## RESUMO

A doença de Huntington (DH) é uma doença neurodegenerativa fatal caracterizada por alterações motoras progressivas, distúrbio emocional e demência. É causada por uma mutação no gene que codifica a proteína huntingtina, levando a uma expansão no trinucleotídeo CAG. Os indivíduos acometidos pela DH apresentam sintomas motores, psiquiátricos e cognitivos que incluem principalmente movimentos involuntários arrítmicos, depressão, irritabilidade, perda de memória e atenção. O estágio sintomático é definido pelo aparecimento de sintomas motores que, normalmente, surgem entre os 30 e os 50 anos de idade. Entretanto, distúrbios de humor, e déficits cognitivos podem ocorrer até uma década antes da manifestação dos sintomas motores. O camundongo transgênico YAC128 é um modelo da DH que apresenta comportamento tipo-depressivo, déficits cognitivos e diminuição da neurogênese hipocampal. O ambiente enriquecido (AE) é um procedimento comportamental no qual os animais são expostos a alta estimulação em comparação com as condições de habitação convencionais. O AE pode promover a plasticidade em várias regiões do encéfalo. Neste estudo, camundongos selvagens e YAC128 foram expostos ao AE entre 2 e 4 meses de idade. No final deste período, foi avaliada a proliferação celular (antígeno nuclear de proliferação celular, PCNA e Ki-67), a diferenciação neuronal (doublecortina, DCX) e a arborização dendrítica (análise de Sholl usando neurônios marcados para DCX) no giro denteado (GD) da formação hipocampal. O AE aumentou a proliferação celular em camundongos selvagens e aumentou a diferenciação neuronal em camundongos selvagens e nos YAC128. A arborização dendrítica também foi aumentada pelo AE em camundongos selvagens de modo que a distância máxima alcançada pelos neurônios imaturos e o número de intersecções dos dendritos na análise de Sholl foram aumentados. Este estudo confirmou que a exposição a um AE é capaz de modular a neuroplasticidade hipocampal em camundongos selvagens e em camundongos YAC128. O AE pode exercer um possível papel terapêutico no tratamento dos prejuízos na neuroplasticidade que ocorrem na DH.

**Palavras-chave:** Doença de Huntington. Hipocampo. Neuroplasticidade. Camundongo YAC128.



## ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is a fatal neurodegenerative disorder characterized by progressive motor deficits, emotional disturbance and dementia. It is caused by a mutation in the gene that code for the huntingtin protein, leading to an expansion in the CAG trinucleotide. The HD patients present motor, psychiatric and cognitive symptoms that include mainly involuntary movements, depression, irritability, memory, and attention loss. The symptomatic stage is defined by the onset of motor symptoms that usually arise between the ages of 30 and 50. However, mood disturbances and cognitive deficits can occur even one decade before the manifestation of motor symptoms. The YAC128 transgenic mouse is a HD model that presents depressive-like behavior, cognitive deficits and decreased hippocampal neurogenesis. The enriched environment (EE) is a behavior procedure in which animals are exposed to high stimulation compared to conventional housing conditions. EE can promote plasticity in various brain regions. In this study, wild-type (WT) and YAC128 mice were exposed to EE between the 2 and 4 months of age. In the end of this period, cell proliferation (proliferating cell nuclear antigen, PCNA e Ki-67), neuronal differentiation (doublecortin, DCX) and the dendritic arborization (Sholl analysis using DCX marked neurons) in the dentate gyrus of hippocampal formation were evaluated. EE increased the cell proliferation in WT mice and increased the differentiation in WT and YAC128 mice. Dendritic arborization was also increased by the EE in WT mice, the maximum distance reached by the immature neurons, and the total number of dendrites intersections in the Sholl analysis were increased. This study confirmed that exposure to an EE is able of modulating hippocampal neuroplasticity in WT mice and YAC128 mice. EE may play a potential therapeutic role in the treatment of neuroplasticity deficit that occurs in DH.

**Keywords:** Huntington's disease. Hippocampus. Neuroplasticity. Mouse YAC128.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Neurogênese na ZSG do GD da formação hipocampal. ....	30
Figura 2 - Estágios da neurogênese.....	32
Figura 3 - Linha do tempo que correlaciona as mudanças comportamentais e neuropatológicas da DH em camundongos YAC128. ....	34
Figura 4 - Métodos de enriquecimento ambiental para roedores em cativeiro.....	35
Figura 5 – Efeitos do AE no SNC.....	37
Figura 6 - Exemplo do gel da genotipagem dos camundongos YAC128. ....	45
Figura 7 - Representação esquemática dos grupos experimentais. ....	46
Figura 8 - Protocolo experimental.....	47
Figura 9 - Resumo da transformação da fotografia de um neurônio para análise de Sholl no programa Fiji.....	52
Figura 10 - Avaliação dos efeitos do AE sobre a proliferação celular na ZSG do GD da formação hipocampal de camundongos selvagens e YAC128 utilizando o marcador endógeno Ki-67.....	55
Figura 11 - Avaliação dos efeitos do AE sobre a proliferação celular na ZSG do GD da formação hipocampal de camundongos selvagens e YAC128 utilizando o marcador endógeno PCNA. ....	57
Figura 12 - Avaliação dos efeitos do AE sobre a diferenciação neuronal na ZSG do GD da formação hipocampal de camundongos selvagens e YAC128, através de imuno-histoquímica para DCX. ....	59
Figura 13 - Avaliação dos efeitos do AE sobre a arborização dendrítica na ZSG do GD da formação hipocampal de camundongos selvagens e YAC128, através da distância máxima alcançada pelos dendritos.....	61
Figura 14 - Avaliação dos efeitos do AE sobre a arborização dendrítica na ZSG do GD da formação hipocampal de camundongos selvagens e YAC128, através da somatória das intersecções da análise de Sholl. ...	63
Figura 15 - Avaliação dos efeitos do AE sobre a arborização dendrítica na ZSG do GD da formação hipocampal de camundongos selvagens e YAC128, através do número de intersecções por raio. ....	65





## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Modelos animais genéticos da DH.....	33
Quadro 2 - Objetos utilizados no AE. ....	44



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABC – Complexo de avidina biotina, do inglês avidin-biotin complex  
AC – Ambiente controle  
AE – Ambiente enriquecido  
ANOVA – Análise de variância, do inglês analysis of variance  
BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo, do inglês brain-derived neurotrophic factor  
BrdU – Bromodeoxyuridine  
CA – Corno de Amon, do latim *Cornu Ammonis*.  
CAG – Citosina, adenina, guanina (glutamina)  
CPF – Córtex pré-frontal  
DAB – 3,3' Diaminobenzidina tetrahidrocloroeto  
DCX – Doublecortina, do inglês doublecortin  
DH – Doença de Huntington  
EE – Ambiente enriquecido, do inglês enriched environment  
ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês enzyme linked immunosorbent assay  
EPM – Erro padrão da média  
FGF-2 – Fator de crescimento de fibroblasto-2, do inglês fibroblast growth factor  
GABA – Ácido gama-aminobutírico, do inglês gamma-aminobutyric acid  
GD – Giro dentado  
GFAP – Proteína ácida fibrilar glial, do inglês glial fibrillary acidic protein  
IgG – Imunoglobulina G  
IT15 – Transcrito interessante 15, do inglês interesting transcript 15  
LSD – Diferença mínima significativa, do inglês least significant difference  
NeuN – Antígeno nuclear neuronal, do inglês neuronal nuclear antigen  
NeuroD – Fator de diferenciação Neurogênico, do inglês neurogenic differentiation factor  
NGF – Fator de crescimento nervoso, do inglês nerve growth factor  
PBS – Tampão fosfato-salino, do inglês Phosphate Buffered Saline  
Poli-Q – Poliglutamina  
PCNA – Antígeno nuclear de proliferação celular, do inglês Proliferating cell nuclear antigen  
PCR – Reação em cadeia da polimerase, do inglês polymerase chain reaction

RE1/NRSE – elemento repressor 1/elemento silenciador restrito ao neurônio, do inglês repressor element 1/neuron-restrictive silencer element

SNC – Sistema Nervoso Central

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial, do inglês vascular endothelial growth factor

WT – Tipo selvagem, do inglês wild-type

YAC – Cromossomo artificial de levedura, do inglês, yeast artificial chromosome

ZSG – Zona subgranular

ZSV – Zona subventricular

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
1.1 DOENÇA DE HUNTINGTON.....	23
1.2 NEUROPATOLOGIA DA DOENÇA DE HUNTINGTON.....	26
1.3 FORMAÇÃO HIPOCAMPAL NA DOENÇA DE HUNTINGTON .....	28
1.4 NEUROPLASTICIDADE.....	29
<b>1.4.1 Neurogênese hipocampal.....</b>	<b>29</b>
1.5 MODELOS ANIMAIS DA DOENÇA DE HUNTINGTON .....	33
1.6 AMBIENTE ENRIQUECIDO .....	35
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>39</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
4.1 ANIMAIS .....	43
4.2 CONDIÇÕES DE HABITAÇÃO .....	43
<b>4.2.1 Ambiente Controle.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2.2 Ambiente Enriquecido.....</b>	<b>43</b>
4.3 GENOTIPAGEM DOS ANIMAIS .....	44
4.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	45
4.5 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	47
<b>4.5.1 Processamento do tecido cerebral .....</b>	<b>47</b>
<b>4.5.2 Imuno-histoquímica.....</b>	<b>47</b>
4.5.2.1 Proliferação celular (Ki-67) .....	48
4.5.2.2 Proliferação celular (PCNA) .....	49
4.5.2.3 Diferenciação neuronal (DCX) .....	49
4.6 QUANTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA .....	50
4.7 ANÁLISE DE SHOLL.....	50
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
5.1 EFEITO DO AE SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR HIPOCAMPAL.....	53
<b>5.1.1 Efeito do AE Sobre a Expressão do Marcador de Proliferação Celular Ki-67 na ZSG do GD da Formação Hipocampal.....</b>	<b>53</b>
<b>5.1.2 Efeito do AE Sobre a Expressão do Marcador de Proliferação Celular PCNA na ZSG do GD da Formação Hipocampal .....</b>	<b>56</b>
5.2 EFEITO DO AE SOBRE A DIFERENCIAÇÃO NEURONAL HIPOCAMPAL.....	58

5.3 EFEITO DO AE SOBRE A ARBORIZAÇÃO DENDRÍTICA HIPOCAMPAL.....	60
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>8 PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DOENÇA DE HUNTINGTON

A doença de Huntington (DH) é a mais comum das doenças neurodegenerativas autossômicas dominantes com início na idade adulta, é uma patologia fatal, atualmente sem cura, caracterizada por alterações motoras progressivas, distúrbio emocional, demência e morte neuronal (GIL e REGO, 2008; JANUÁRIO, 2011).

Os primeiros relatos da DH datam de 1842, feitos por Charles Waters, o qual descreveu que os pacientes sofriam alterações variáveis da atividade muscular, com gravidade desigual, mas acabando todos por desenvolver gradualmente e de forma uniforme uma situação de demência (WATERS, 1842). Apesar de outra publicação no ano de 1860, escrita pelo médico norueguês Johan Lund, relatar o caráter hereditário da doença (HEATHFIELD, 1973), foi somente em 1872, com a publicação “On Chorea”, do médico George Huntington, que a patologia ganhou uma descrição mais detalhada. George Huntington relatou com certa precisão para época, as características clínicas da doença, o caráter hereditário, o declínio mental e os movimentos involuntários, dançantes, que classifica de coreia e que seriam os marcadores clínicos da doença – o termo coreia vem do latim (*choreus*) e significa dança (BATES, 2005). No entanto, apenas após 1955 a DH veio a ser estudada com mais profundidade devido às observações do médico venezuelano, Américo Negrette. Ele examinou dezenas de doentes na região do Lago Maracaíbo, na província de Zulia, na Venezuela, a região do mundo com maior população de indivíduos afetados pela DH.

Várias equipes de especialistas conduziram uma investigação na região do lago Maracaíbo que levou a descoberta do gene no cromossomo 4, em 1983 (GUSELLA *et al.*, 1983) e, posteriormente, a identificação da mutação genética responsável pela doença (HUNTINGTON’S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP, 1993). A mutação ocorre na porção 5’ do gene IT15 ou “Interesting Transcript 15” no braço curto do cromossomo 4, na posição 4p16.3, que codifica a proteína huntingtina. Tal mutação resulta numa expansão instável da sequência de nucleotídeos citosina, adenina e guanina (CAG – que codifica o aminoácido glutamina), resultando em uma proteína mutante com uma sequência de poliglutaminas (poli-Q) no terminal amínico da proteína huntingtina (HUNTINGTON’S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP, 1993).

A expansão da sequência CAG com mais de 35 repetições pode estar associada com a presença clínica da DH. O intervalo do alelo intermediário para DH está entre 27 e 35 repetições CAG (SEMAKA *et al.*, 2006). O alelo normal da huntingtina transmite-se de geração em geração de uma forma mendeliana, o alelo mutado é muito instável durante a meiose, mudando o seu tamanho na transmissão intergeracional aumentando 1 a 4 unidades ou reduzindo 1 a 2 unidades, sendo que os maiores acréscimos ocorrem na transmissão paterna (HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP, 1993). Um indivíduo com um alelo na faixa entre 35 e 39 repetições de CAG pode ou não desenvolver sintomas em uma idade mais avançada, pois a penetrância desse alelo é reduzida. Com 40 repetições ou mais o alelo está associado com a doença de forma que quanto maior a quantidade de repetições mais cedo os sintomas se iniciam (LANGBEHN *et al.*, 2004). Além disso, a expansão das repetições é instável, acarretando em alongamento e, conseqüentemente, início mais precoce ao longo de sucessivas gerações (SCHÖLS *et al.*, 2004). O comprimento da expansão é responsável por 50 a 70% da variância na idade de início, sendo esta também condicionada por outros fatores genéticos ou fatores ambientais (LANGBEHN *et al.*, 2004).

O aparecimento dos primeiros sintomas da DH ocorre geralmente na idade adulta, entre os 35 e 50 anos de idade. A doença progride ao longo do tempo, tornando-se fatal entre 15 a 20 anos após o aparecimento dos primeiros sintomas (ROSS e TABRIZI, 2011). A DH apresenta uma tríade de sintomas: déficits cognitivos, desordens psiquiátricas e distúrbios motores. Dentro deles o mais aparente é a coreia (distúrbio motor) progressiva (VAN DELLEN *et al.*, 2005; ROOS, 2010). No entanto, os primeiros sinais da doença são sutis e podem variar bastante entre cada indivíduo. Numa fase precoce, podem ser observadas alterações moderadas na execução dos movimentos, dificuldades na resolução de problemas, irritabilidade e depressão.

As alterações motoras, associadas à perda de coordenação dos movimentos voluntários, progridem de forma lenta. Os movimentos involuntários dos músculos (especialmente membros superiores, inferiores e da face) tornam-se mais graves, o tremor, a distonia, bem como a falta de coordenação motora e a lentidão para iniciar os movimentos evoluem da hipercinesia até a hipocinesia e os pacientes perdem gradualmente a capacidade dos movimentos da fala e deglutição em fases mais avançadas da doença (GARCIA RUIZ *et al.*, 2000; ROOS, 2010).



As manifestações psiquiátricas são muito frequentes, entre 33 a 76% dos casos. A depressão e a apatia são comuns, bem como a ansiedade e a irritabilidade, que são sintomas dos estágios iniciais e se mantêm ao longo da evolução da doença. Na literatura é sempre referido o risco de suicídio aumentado nos estágios iniciais da doença e nos portadores assintomáticos (VAN DUIJN *et al.*, 2014). A existência de depressão, o isolamento, a deterioração cognitiva inicial e a idade jovem parecem funcionar como fatores de risco (ORTH *et al.*, 2011). Segundo Farrer (1986), o suicídio na DH é cinco vezes mais frequente do que na população geral, e estima-se que ao longo do percurso da doença mais de 25% dos afetados apresentam comportamentos suicidas (FARRER, 1986).

O declínio cognitivo pode anteceder as outras manifestações ou surgir nas fases mais avançadas. Caracteriza-se por alterações nas capacidades visuoespaciais, com incapacidade no planeamento, organização e avaliação de tarefas, falta de iniciativa, diminuição da habilidade de elaborar estratégias para mudança de ação, bem como também déficit de atenção, alteração da memória de trabalho e da linguagem (PAULSEN *et al.*, 2008). As alterações cognitivas tendem a piorar ao longo do tempo, onde os doentes em fase tardia podem apresentar demência severa (FOLSTEIN *et al.*, 1983).

Embora a DH seja uma doença progressiva, sua taxa de progressão varia de indivíduo para indivíduo, o que pode sugerir que fatores ambientais podem influenciar na progressão desta doença. A morte geralmente ocorre devido a complicações respiratórias infecciosas, cardiovasculares ou até mesmo por quedas, engasgos e suicídio (ROOS, 2010). Os critérios usados para o diagnóstico da DH incluem: histórico familiar de DH, déficit motor progressivo associado à coréia ou rigidez, bem como alterações psiquiátricas com demência progressiva, sem outra causa definida (BONELLI e HOFMANN, 2007; ROSS e TABRIZI, 2011). Os indivíduos que apresentam estes sintomas são submetidos ao teste genético, de forma a avaliar a presença da mutação associada à DH e confirmar o diagnóstico (GIL-MOHAPEL e REGO, 2011).

O tratamento atual para a DH é sintomático e envolve uma abordagem multidisciplinar envolvendo médicos, enfermeiros, fisioterapeutas, fonoaudiólogos, nutricionistas e outros profissionais de saúde (WYANT *et al.*, 2017). A única droga especificamente licenciada para tratar a coréia é a tetrabenazina, porém ela causa efeitos colaterais como problemas de sono, depressão, ansiedade e agitação. A deutetabenazina é uma versão modificada da tetrabenazina que contém moléculas de deutério e resulta em uma meia-vida prolongada, com

menor variabilidade do metabolismo e uma possível diminuição dos efeitos colaterais (RODRIGUES *et al.*, 2017). Outros sintomas motores como a marcha anormal, desequilíbrio e quedas frequentes são tratados geralmente com fisioterapia (EDDY *et al.*, 2016; MCCOLGAN e TABRIZI, 2017). Os sintomas psiquiátricos podem ser tratados com intervenções não farmacológicas, como terapias, no entanto, essas abordagens podem ser limitadas no contexto de comprometimento cognitivo. Além disso, também são utilizadas abordagens farmacológicas com inibidores seletivos da captação de serotonina (citalopram, fluoxetina, paroxetina e sertralina) e mirtazepina e venlafaxina, que possuem efeitos serotoninérgicos e noradrenérgicos (EDDY *et al.*, 2016). Ensaios clínicos têm sugerido que inibidores da acetilcolinesterase podem ter um efeito benéfico sobre a cognição em alguns pacientes com a DH, porém esses achados não foram conclusivos (ROT *et al.*, 2002; DE TOMMASO *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2015).

## 1.2 NEUROPATOLOGIA DA DOENÇA DE HUNTINGTON

A proteína huntingtina mutante é expressa em todo o organismo, entretanto ela é mais expressa no tecido cerebral, tendo também concentrações no fígado, coração e pulmões. Localiza-se principalmente no citoplasma, associada a organelas como mitocôndrias, complexo de Golgi, retículo endoplasmático, vesículas sinápticas e diversos componentes do citoesqueleto (HOFFNER *et al.*, 2002), mas pode também estar presente, com menor frequência, dentro do núcleo das células (LANDLES e BATES, 2004). A proteína huntingtina é essencial para o desenvolvimento embrionário, tem importante função sináptica, no transporte intracelular de vesículas e organelas e ação anti-apoptótica (ZEITLIN *et al.*, 1995; KALTENBACH *et al.*, 2007). A expansão de poliQ confere novas propriedades físicas à proteína que se traduzem em anomalias no seu comportamento. A proteína mutada apresenta alterações na degradação, na localização sub-celular, na maturação pós-tradução e na interação com outros elementos moleculares, bem como uma tendência para agregação dentro da célula (SAUDOU e HUMBERT, 2016). Em neurônios a presença da huntingtina mutada pode causar alterações morfológicas como diminuição do tamanho e densidade dos dendritos (SPIRES *et al.*, 2004; KUHN *et al.*, 2007). A huntingtina mutante é clivada por proteases, gerando fragmentos N-terminais contendo a polyQ expandida anormal. Estes fragmentos se translocam para o núcleo onde interferem na transcrição (ROSS e TABRIZI, 2011; SAUDOU e HUMBERT, 2016). Todas estas alterações induzem a multiplicidade de

disfunções celulares que levarão à morte neuronal (TAKAHASHI *et al.*, 2010).

Ainda existe muita dúvida sobre o papel dos agregados de huntingtina na patologia da DH. A agregação da huntingtina mutante pode ser um dos fatores desencadeadores de lesão celular na DH (DIFIGLIA *et al.*, 1997). Várias proteínas interagem de forma anormal com a huntingtina mutante e são recrutadas para os agregados proteicos, causando a desregulação de importantes vias intracelulares (SAUDOU e HUMBERT, 2016). Por outro lado, as inclusões de huntingtina mutante podem apenas representar um efeito secundário da disfunção celular, podendo exercer um efeito protetor durante as fases iniciais da doença. É possível que as inclusões representem um meio da célula sequestrar fragmentos e oligômeros tóxicos de huntingtina mutante (KUEMMERLE *et al.*, 1999; GIL-MOHAPEL e REGO, 2011).

Outros mecanismos que estão envolvidos com a morte celular na DH são o prejuízo na autofagia e na função do proteossoma, a disfunção mitocondrial que leva ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio e ao aumento da apoptose (CAVISTON e HOLZBAUR, 2009).

A neurodegeneração na DH é bem evidente em áreas específicas nos núcleos basais e no córtex cerebral (REINER *et al.*, 1988; STOREY e BEAL, 1993). Os núcleos basais constituem um conjunto de estruturas cerebrais subcorticais envolvidos em diversos aspectos do controle motor e de cognição (GRAYBIEL, 1990; MITCHELL *et al.*, 1999). Nesta região, o processo neurodegenerativo inicia no estriado (VONSATTEL *et al.*, 1985), uma região que recebe projeções de diversas áreas corticais (MITCHELL *et al.*, 1999), onde a morte neuronal ocorre principalmente no núcleo caudado e no putâmen (SCHALLER, 1928; VONSATTEL e DIFIGLIA, 1998; MITCHELL *et al.*, 1999; ROSS e TABRIZI, 2011). Os neurônios mais afetados no estriado são os neurônios espinhosos médios, que se projetam para o globo pálido externo (via indireta), os quais são GABAérgicos e, portanto, utilizam o neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA). Eles correspondem a aproximadamente 95% do número total de neurônios estriatais. A perda do efeito inibitório causada pela morte desses neurônios, na via indireta, tem sido diretamente associada aos movimentos involuntários característicos da DH (CROSSMAN, 1987; CROSSMAN *et al.*, 1988; HAN *et al.*, 2010). Com a progressão da doença, os neurônios espinhosos médios que se projetam para o globo pálido interno (via direta) e neurônios piramidais corticais também são afetados. A degeneração tardia dos neurônios da via direta é responsável pelo desenvolvimento de bradicinesia e rigidez em estágios terminais da doença (BERARDELLI *et al.*, 1999). A perda significativa

de neurônios é também relatada no córtex cerebral de pacientes, incluindo as regiões frontal, parietal e temporal (HEDREEN *et al.*, 1991; MANN *et al.*, 1993; HEINSEN *et al.*, 1994; ROSAS *et al.*, 2002) e cerebelares (RODDA, 1981; JESTE *et al.*, 1984).

### 1.3 FORMAÇÃO HIPOCAMPAL NA DOENÇA DE HUNTINGTON

Muito da pesquisa em Huntington tem focado na degeneração estriatal que está relacionada ao componente motor da DH. Enquanto outras regiões cerebrais têm recebido menos atenção. No entanto, pacientes com a DH apresentam perda celular em regiões não estriatais, como a formação hipocampal (SPARGO *et al.*, 1993; VONSATTEL e DIFIGLIA, 1998; ROSAS *et al.*, 2003). A perda neuronal nessa região poderia estar envolvida com a sintomatologia comportamental que os doentes apresentam nas fases iniciais.

A formação hipocampal é uma região cerebral que faz parte do sistema límbico e que está muito relacionada com a cognição, em particular com vários aspectos de aprendizagem e memória, além disso é uma das poucas regiões no cérebro adulto que retém a capacidade de produzir novos neurônios (neuroplasticidade estrutural) (COLLINGRIDGE *et al.*, 2010; LEUNER e GOULD, 2010). É constituída pelo hipocampo, giro denteado (GD), complexo subicular e córtex entorrinal. O hipocampo propriamente dito é denominado Cornu Ammonis, ou corno de Amon (CA). Duas estruturas são funcionalmente distintas na formação hipocampal: a subregião dorsal e a ventral (FANSELOW e DONG, 2010). Enquanto formação hipocampal dorsal está especificamente envolvida na aprendizagem espacial e na memória, a ventral parece principalmente implicar na regulação das respostas ao estresse, emoções e afeto (BANNERMAN *et al.*, 2004) (DEGROOT e TREIT, 2004). Estudos têm relatado alterações na neuroplasticidade hipocampal em diferentes modelos da DH (ANDREASSEN *et al.*, 2001; NITHIANANTHARAJAH *et al.*, 2008; ZUCCATO *et al.*, 2010) e essas alterações são acompanhadas por comprometimento cognitivo (CIAMEI e MORTON, 2008) e pelo desenvolvimento do fenótipo tipo-depressivo (PANG *et al.*, 2008). Além disso, alguns estudos demonstraram que uma redução da capacidade neurogênica da formação hipocampal pode ser detectada antes do aparecimento dos sintomas motores em diferentes modelos transgênicos da DH (MURPHY *et al.*, 2000; 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.*, 2008).

## 1.4 NEUROPLASTICIDADE

A neuroplasticidade faz parte de uma gama de recursos neurais que podem contribuir para a flexibilidade comportamental dos indivíduos e tem papel fundamental na adaptação às contingências ambientais (KEMPERMANN *et al.*, 2002). A formação hipocampal exerce funções envolvidas com aquisição de memórias e aprendizagem em grande parte através da neuroplasticidade. A neuroplasticidade é a capacidade do sistema nervoso para modificar sua organização anatômica e/ou funcional durante o desenvolvimento normal e a maturação do organismo ou em consequência de eventos como a aquisição de novas habilidades (aprendizagem) ou ainda após danos ao sistema nervoso e como resultado de privação sensorial visual, por exemplo (BAVELIER e NEVILLE, 2002; SPOLIDORO *et al.*, 2009).

Existem dois tipos de neuroplasticidade, a plasticidade funcional e a plasticidade estrutural. A plasticidade funcional é caracterizada pelo fortalecimento, enfraquecimento e/ou remodelamento das sinapses existentes (GAGE, 2004), enquanto a plasticidade estrutural é caracterizada pelo processo de neurogênese adulta e por alterações numéricas e morfológicas dos espinhos dendríticos (FUCHS e FLÜGGE, 2014).

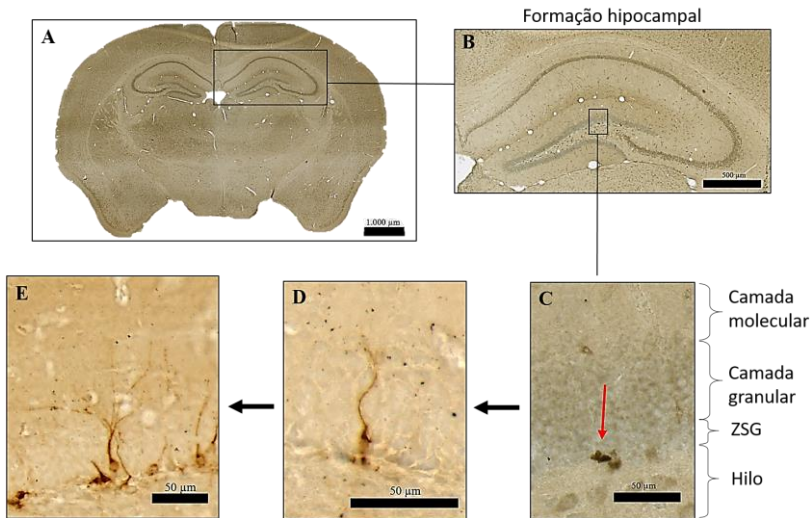
A neurogênese, ou seja, a capacidade de gerar novos neurônios, faz parte da plasticidade estrutural, e, em mamíferos adultos, está restrita a duas regiões cerebrais: a formação hipocampal, especificamente, na zona subgranular (ZSG) do GD e na zona subventricular (ZSV) dos ventrículos laterais cerebrais (KUHN *et al.*, 1996; LLEDO *et al.*, 2006; MING e SONG, 2011).

### 1.4.1 Neurogênese hipocampal

O processo da neurogênese acontece com a geração de novos neurônios a partir de células tronco neurais ou de células progenitoras. A maioria das células no SNC são geradas durante o período embrionário e no período pós-natal precoce. No entanto, é bem aceite que a neurogênese continua durante a vida adulta de roedores, primatas não humanos e

humanos (ERIKSSON *et al.*, 1998; DRAPEAU e NORA ABROUS, 2008; JIN, 2016). A sequência de etapas da neurogênese adulta consiste basicamente na proliferação das células-tronco, especificação do destino dos progenitores neurais para a diferenciação em neuroblastos e posterior maturação, organização dos axônios e dendritos, formação de sinapses funcionais, e sobrevivência seletiva de neurônios novos (DUAN *et al.*, 2008; (GE *et al.*, 2008) (Figura 1). As células do tipo 1, também denominadas células tipo glia radial são encontradas no nicho de células tronco e podem dar origem a células que irão manter a taxa celular de auto-renovação (células tipo 2a) e a progenitores intermediários (células do tipo 2b) que apresentam características transitórias de amplificação (proliferação). Ocorre então uma transição da fase mitótica para a fase pós-mitótica, onde essas células do tipo 2b podem dar origem a neuroblastos (células do tipo 3) (diferenciação), que subsequentemente darão origem a neurônios maduros (maturação) (KEMPERMANN *et al.*, 2015; GONÇALVES *et al.*, 2016).

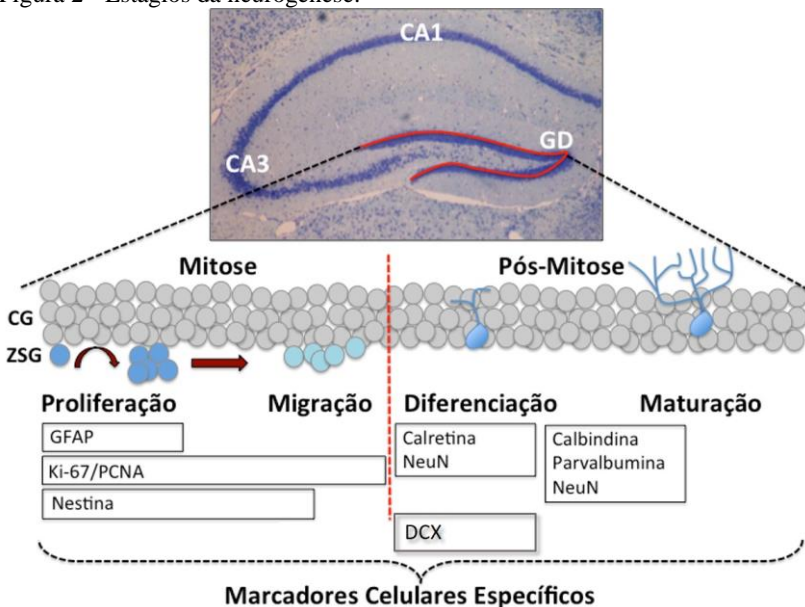
Figura 1 - Neurogênese na ZSG do GD da formação hipocampal.



Legenda: Neurogênese na ZSG do GD da formação hipocampal. A) Fotomicrografia de um corte coronal de encéfalo de camundongo (Barra de escala = 1000µm). B) Fotomicrografia da região da formação hipocampal aumentada (Barra de escala = 500µm). C) Fotomicrografia da região das camadas do GD em aumento, flecha destacando uma célula em fase de proliferação. D) e E) Fotomicrografias da região granular com neuroblastos em fase de diferenciação e migração (C-D Barra de escala = 50µm). ZSG: zona subgranular. Fonte: Autor, 2017.

As células geradas na ZSG do GD da formação hipocampal tem sua posição final na camada granular do GD (GARCÍA-VERDUGO *et al.*, 2002). Em cada fase na qual a neurogênese se encontra, as células expressam diferentes proteínas, que podem ser rastreadas, através da utilização de técnicas laboratoriais específicas (UND HALBACH, 2007). As células do tipo 2b que estão em constante processo mitótico expressam em seu núcleo a proteína Ki-67, que é expresso em todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 e M) exceto a fase de repouso e no início da fase G1, por causa de sua meia-vida curta de cerca de 1 h, raramente é detectável em células na fase G0. O Ki-67 não é detectável durante os processos de reparo do DNA (KEE *et al.*, 2002; ZACCHETTI *et al.*, 2003). Outra proteína expressa durante a divisão celular é o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) que é uma proteína auxiliar da DNA polimerase, expressa durante a divisão celular principalmente nas fases G1 e S e está diminuído na fase G2 (KURKI *et al.*, 1986; GALAND e DEGRAEF, 1989). Já no processo de migração e arborização dendrítica, estas células expressam a proteína associada aos microtúbulos doublecortina (DCX), fosfoproteína que controla os processos de polimerização e estabilização do citoesqueleto, desempenhando um papel chave no posicionamento final dos neurônios novos (BURGESS e REINER, 2000; BOSERET *et al.*, 2007; CAI *et al.*, 2009) (Figura 2).

Figura 2 - Estágios da neurogênese.



Legenda: Esquema dos estágios da neurogênese da formação hipocampal adulta: proliferação, diferenciação, migração, localização, maturação. Na parte inferior está demonstrada a expressão de marcadores específicos de cada estágio. CG: Camada granular; ZSG: Zona subgranular; GFAP: Proteína ácida fibrilar glial; PCNA: Antígeno nuclear da proliferação celular; DCX: Doublecortina; NeuN: Antígeno nuclear neuronal. Fonte: Castro *et al.*, (2017).

A neurogênese pode ser modulada de forma endógena, através de neurotrofinas, por exemplo, fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), fatores de crescimento, por exemplo, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento de fibroblasto-2 (FGF-2) hormônios e citocinas (ZHAO *et al.*, 2008; KANG e HÉBERT, 2015; WANG *et al.*, 2015). Estímulos externos também já estão bem descritos por promover a neurogênese como fármacos antidepressivos (MALBERG *et al.*, 2000; SANTARELLI *et al.*, 2003), exercício físico (THARMARATNAM *et al.*, 2017) e o ambiente enriquecido (AE) (KEMPERMANN *et al.*, 1998a; VAN PRAAG *et al.*, 1999; VAN PRAAG *et al.*, 2000). Por outro lado, alguns processos regulam negativamente a neurogênese, como por exemplo, o estresse crônico (CAMERON e GOULD, 1994; GOULD *et al.*, 1998; TANAPAT *et al.*, 1998), o envelhecimento (KUHN *et al.*, 1996) e a depressão (DRANOVSKY e HEN, 2006; MILLER e HEN, 2015).



## 1.5 MODELOS ANIMAIS DA DOENÇA DE HUNTINGTON

Atualmente, existem alguns modelos de animais transgênicos disponíveis para estudar a DH, portadores de parte ou da totalidade do gene mutado, proporcionando uma fonte muito importante de investigação da DH (HICKEY e CHESSELET, 2003; EHRNHOFER *et al.*, 2009). Muitos desses modelos são em camundongos como disposto no Quadro 1.

Quadro 1 - Modelos animais genéticos da DH.

Linhagem de camundongo	Modelo	Tipo de mutação	Número de repetições CAG	Início dos sintomas motores	Tempo de vida
C57BL/6xCBA	R6/2	Fragmento transgênico	~150	6 semanas	10-13 semanas
C57BL/6xCBA ou C57BL/6	R6/1	Fragmento transgênico	116	18 semanas	32-40 semanas
C57BL/6xC3H/He	N171-82Q	Fragmento transgênico	82	3 meses	16-22 semanas
C57BL/6xSJL	Tg100	Fragmento transgênico	100	3 meses	Normal
C57BL/6xCBA	HD94	Fragmento transgênico	94	4-8 semanas	Normal
FVB/N	YAC72	Transgênico gene inteiro	72	17 meses	Normal
FVB/N	YAC128	Transgênico gene inteiro	120	6 meses	Normal
FVB/N	BACHD	Transgênico gene inteiro	97	2 meses	Normal
Mixed 129Sv, C57BL/6	HdhQ72, Q80	Knockin	72,8	12 meses	Normal
Mixed 129Sv, CD1	HdhQ111	Knockin	109	24 meses	Normal
Mixed 129Sv, C57BL/6	HdhQ94	Knockin	94	2 meses	Normal
Mixed 129Sv, C57BL/6	HdhQ140	Knockin	140	4 meses	Normal
Mixed 129Ola, C57BL/6	HdhQ150	Knockin	150	100 semanas	Normal

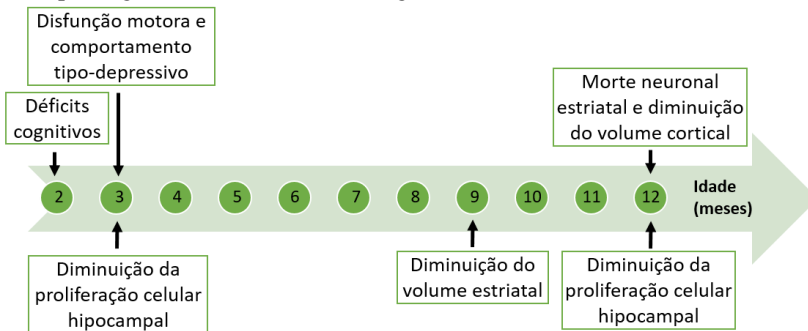
Fonte: Adaptado de Crook e Housman (2011).

Os modelos R6/1 e R6/2 foram os primeiros modelos transgênicos de DH desenvolvidos. Foram feitos em 1996 a partir da introdução de um fragmento de gene de huntingtina humana no genoma do camundongo (MANGIARINI *et al.*, 1996). Esses modelos apresentam sintomas motores e metabólicos, além de uma progressão rápida dos sintomas. No entanto, a ausência da mutação inteira da huntingtina e a rápida progressão da doença levaram ao desenvolvimento de outros modelos com diferentes características (CROOK e HOUSMAN, 2011).

O camundongo transgênico YAC128, criado a partir da linhagem FVB/N expressa o gene inteiro humano da DH com aproximadamente 128 repetições de CAG e apresenta uma degeneração seletiva dos neurônios estriatais com uma deterioração motora progressiva e uma sobrevida longa (SLOW *et al.*, 2003). Sendo assim, essa linhagem é considerada a mais representativa da condição humana (VAN RAAMSDONK *et al.*, 2007).

Os camundongos YAC128 exibem comprometimento motor a partir dos 3 meses de idade. Este déficit é bifásico, com um período inicial de hiperatividade seguido por uma fase hipoativa, semelhante ao que é observado em indivíduos humanos portadores da DH (VAN RAAMSDONK *et al.*, 2007). O aparecimento dos déficits motores está correlacionado com a perda dos neurônios estriatais nos camundongos YAC128 (SLOW *et al.*, 2003). Aos 2 meses de idade esses camundongos apresentam déficits de aprendizagem nos testes de coordenação motora na barra giratória e no labirinto aquático em T (VAN RAAMSDONK *et al.*, 2005). Além disso, os camundongos YAC128 apresentam também comportamento tipo-depressivo nos estágios iniciais da DH (POULADI *et al.*, 2009). Um estudo sobre neurogênese hipocampal nos camundongos YAC128 demonstrou que há diminuição da proliferação células nesses animais aos 3, aos 12 e aos 18 meses de idade, bem como, diminuição da diferenciação neuronal aos 18 meses (SIMPSON *et al.*, 2011) (Figura 3).

Figura 3 - Linha do tempo que correlaciona as mudanças comportamentais e neuropatológicas da DH em camundongos YAC128.



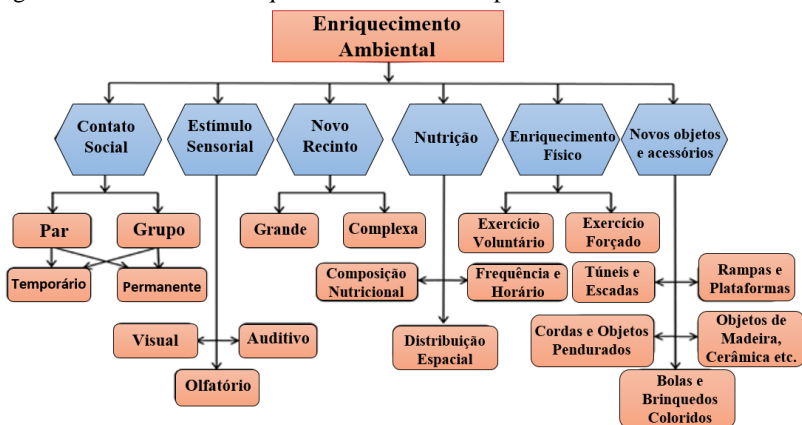
Legenda: Os camundongos YAC128 apresentam déficits cognitivos aos 2 meses de idade, disfunção motora, comportamento tipo-depressivo e diminuição da proliferação celular hipocampal aos 3 meses, seguido por neuropatologia seletiva no estriado aos 8 meses e diminuição do volume cortical aos 12 meses. Fonte: Modificado de Pouladi *et al.*, (2009).

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-MOHAPPEL, 2012).

## 1.6 AMBIENTE ENRIQUECIDO

O AE é definido como uma combinação de estímulos complexos de objetos inanimados e sociais que influenciam aspectos morfofuncionais encefálicos por aumentar a estimulação sensorial, cognitiva, motora e de interação social (GELFO *et al.*, 2011) quando comparado com a condição padrão de habitação. Muitos estudos com roedores têm demonstrado os benefícios do AE para a estimulação de diferentes regiões do encéfalo, influenciando a neuroquímica e neuroanatomia, refletindo no aumento das atividades sensoriais-motoras, interações sociais, desempenho cognitivo e estimulação da plasticidade cerebral (ROSENZWEIG, 1966). Em roedores, o AE pode ser proporcionado de diferentes maneiras (Figura 4).

Figura 4 - Métodos de enriquecimento ambiental para roedores em cativeiro.

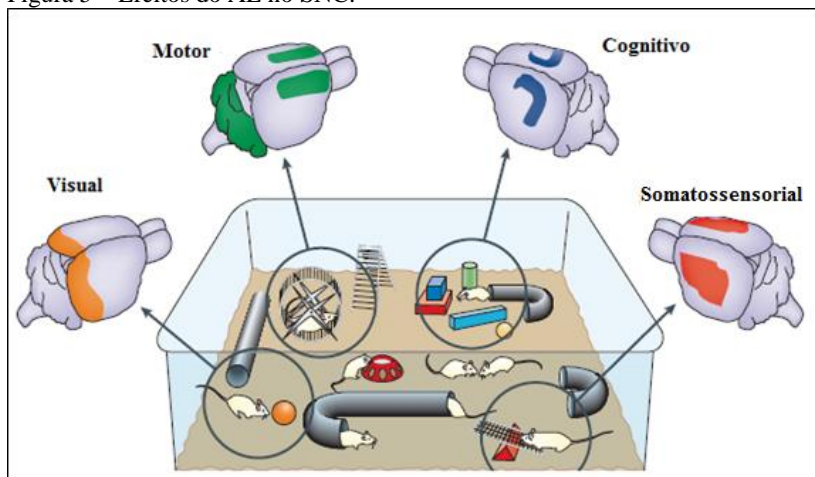


Legenda: Enriquecimento ambiental para roedores em cativeiro pode ser obtido fornecendo contato social (par, grupo, permanente, temporário), atividade física utilizando rodinhas de corrida, recintos novos, maiores e mais complexos, objetos e acessórios novos, estímulo sensorial (visual, auditivo e olfatório), e uma melhor nutrição. Fonte: Modificado de Singhal *et al.*, (2014).

Abordagens equivalentes ao AE podem ser aplicadas em humanos. A exposição ao AE em humanos é capaz de promover estimulação mental, os exercícios aeróbicos modulam a neuroplasticidade e melhoram a capacidade de resposta aos novos desafios e funções psicossociais (SINGHAL *et al.*, 2014). Além disso, o AE é bem conhecido por prevenir o declínio cognitivo relacionado com a idade (FRERET *et al.*, 2012) e amenizar esta ocorrência nos modelos de doenças neurodegenerativas em roedores (VAN PRAAG *et al.*, 2000; NITHIANANTHARAJAH e HANNAN, 2006). Mesmo quando aplicado em roedores adultos saudáveis, o AE de uma forma geral promove uma melhora na execução da memória espacial (KEMPERMANN, 1998b; HUANG *et al.*, 2007) e memória não espacial (RAMPON *et al.*, 2000; TANG *et al.*, 2001; BRUEL-JUNGERMAN *et al.*, 2005). Em roedores, o AE também possui efeito tipo ansiolítico (BENAROYA-MILSHTEIN *et al.*, 2004; GALANI *et al.*, 2007) e antidepressivo (HATTORI *et al.*, 2007; LLORENS-MARTIN *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2009; JHA *et al.*, 2011).

O AE pode promover ativação neuronal, sinalização celular e plasticidade em várias regiões do encéfalo. O aumento da estimulação sensorial e visual ativa os córtices somatossensorial e visual, respectivamente. O aumento da estimulação cognitiva, como por exemplo, a codificação de informações relativas ao espaço, o reconhecimento de objetos, a novidade e a modulação da atenção é capaz de ativar o hipocampo e outras áreas corticais. Além disso, o reforço da atividade motora e exploratória estimula áreas como o córtex motor e o cerebelo (NITHIANANTHARAJAH e HANNAN, 2006) (Figura 5).

Figura 5 – Efeitos do AE no SNC.



Legenda: Ambiente enriquecido e os efeitos da estimulação sensorial, motora e cognitiva em diferentes áreas do encéfalo. Fonte: Modificado de Nithianantharajah e Hannan (2006).

Algumas alterações neurobiológicas que podem estar relacionadas com a exposição ao AE têm sido estudadas. Estudos com roedores alojados em um AE demonstram que há um aumento na espessura cortical (DIAMOND *et al.*, 1964; BENNETT *et al.*, 1969), bem como no volume hipocampal (KEMPERMANN *et al.*, 1997). A exposição ao AE aumenta a plasticidade cerebral por meio de diferentes fatores de crescimento, como o BDNF (ICKES *et al.*, 2000), e aumento da concentração de serotonina e noradrenalina hipocampal (GALANI *et al.*, 2007; BRENES *et al.*, 2009).

Nos encéfalos de indivíduos portadores da DH a expressão de BDNF está reduzida, o que ocorre também em diversos modelos animais da DH (ZUCCATO *et al.*, 2001; ZUCCATO *et al.*, 2005; PANG *et al.*, 2006; ZUCCATO e CATTANEO, 2007; ZUCCATO *et al.*, 2008). Esta redução da expressão de BDNF se correlaciona com os déficits dependentes do hipocampo como aprendizagem e memória (GROTE e HANNAN, 2007; MARTINOWICH *et al.*, 2007; GIRALT *et al.*, 2009) e com a diminuição da neurogênese hipocampal (GIL-MOHAPEL *et al.*, 2011), que ocorrem antes do início do aparecimento dos sintomas motores em diferentes modelos animais da DH (LIONE *et al.*, 1999; MURPHY *et al.*, 2000; PANG *et al.*, 2006; NITHIANANTHARAJAH *et al.*, 2008). Estudos têm demonstrado que nos modelos R6/1 e R6/2 a proliferação

de células precursoras neurais no DG é diminuída (LAZIC *et al.*, 2004; GIL *et al.*, 2004, 2005; (PHILLIPS *et al.*, 2005). Em camundongos R6/1 com 10 e com 25 semanas a proliferação celular, a diferenciação neuronal e o comprimento dos neurítos estão diminuídos no GD, sendo que nos camundongos mais velhos esta diminuição é revertida pela exposição ao AE, durante 21 semanas (LAZIC *et al.*, 2006). Além disso, em camundongos YAC128 a exposição a um enriquecimento cognitivo reduziu a atrofia caudado-putâmen (STEVENTON *et al.*, 2015).

## 2 JUSTIFICATIVA

A DH é uma doença neurodegenerativa de caráter progressivo que não possui cura e, até o momento, não possui um tratamento efetivo para o controle de sua progressão. Devido à falta de um tratamento satisfatório e de um bom prognóstico, indivíduos em risco de serem portadores da DH não se entusiasmam em serem geneticamente testados. No entanto, o tempo ideal para a introdução de estratégias terapêuticas capazes de modificar o curso desta doença é antes do aparecimento do sintoma característico da doença, a coreia, quando já se observa significativa neurodegeneração. O camundongo YAC128 é uma excelente ferramenta para investigar o potencial de estratégias terapêuticas que possam modificar o curso desta doença porque reproduz o fenótipo de um indivíduo com DH. Desta forma, o estudo dos efeitos de uma intervenção não farmacológica como o AE nos estágios iniciais da DH torna-se relevante, já que é de conhecimento que o mesmo pode melhorar a neuroplasticidade hipocampal que está alterada na DH.





### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta dissertação foi investigar se a exposição a um AE é capaz de aumentar a neuroplasticidade na formação hipocampal em camundongos selvagens e em camundongos YAC128.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar se a exposição a um AE, entre os 2 e 4 meses de idade, é capaz de:

- alterar a proliferação celular na ZSG do GD da formação hipocampal em camundongos selvagens e YAC128;
- modificar a diferenciação neuronal na ZSG do GD da formação hipocampal em camundongos selvagens e YAC128;
- alterar a arborização dendrítica na ZSG do GD da formação hipocampal em camundongos selvagens e YAC128.



## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 ANIMAIS**

Os camundongos transgênicos YAC128 e selvagens foram gentilmente doados pelo Dr. Brian R. Christie da University of Victoria, Canadá. A colônia destes animais foi mantida em gaiolas opacas de plástico (30 x 20 x 13 cm) com 6 animais/caixa no biotério setorial do Departamento de Bioquímica na Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, Brasil), em estantes ventiladas e climatizadas a 21-23°C, com livre acesso a água e comida, sob um ciclo claro-escuro de 12:12h (07:00-19:00h) até o início do protocolo experimental. O presente estudo foi realizado com animais transgênicos YAC128 (n = 12) e selvagens (n = 12) de ambos os sexos (13 fêmeas e 11 machos), com idade de 2 meses no início do experimento (Protocolo CEUA: PP00944).

### **4.2 CONDIÇÕES DE HABITAÇÃO**

#### **4.2.1 Ambiente Controle**

O ambiente controle (AC) consistia em gaiolas opacas de plástico medindo 41 x 34 x 16 cm onde ficavam 6 animais cada com água e comida disponível.

#### **4.2.2 Ambiente Enriquecido**

O ambiente enriquecido (AE) consistia em gaiolas opacas de plástico medindo 41 x 34 x 16 cm onde ficavam 4 a 6 animais cada com água e comida disponível. Além disso, nessas gaiolas os objetos expostos no Quadro 2 eram inseridos alternadamente de 1 a 2 vezes por semana, sendo de 3 a 5 objetos por gaiola (Figura 8).

Quadro 2 - Objetos utilizados no AE.



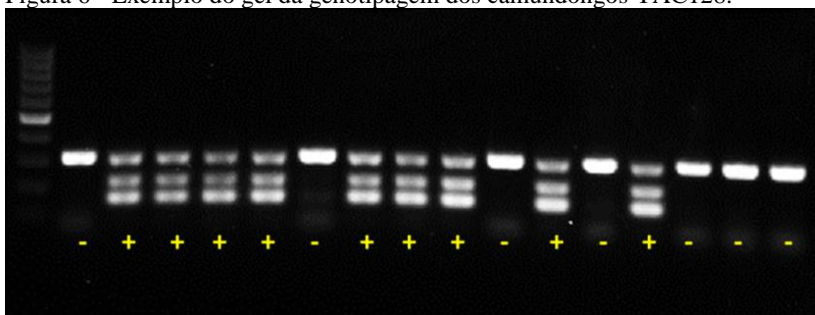
Fonte: Autor, 2017. (Barra de escala = 1 cm)

### 4.3 GENOTIPAGEM DOS ANIMAIS

Amostras de tecido da orelha, coletadas no momento do desmame dos camundongos foram utilizadas para extração do DNA. As amostras foram incubadas em 300 $\mu$ L de solução de lise (250 $\mu$ L de solução de lise nuclear, 50 $\mu$ L de EDTA, 2 $\mu$ L de proteinase K (20mg/ml) e 2 $\mu$ L de solução de RNase) por 3 horas a 55°C. Após a digestão, foram adicionados 100 $\mu$ L de solução de precipitação proteica. Os tubos foram agitados, mantidos no gelo por aproximadamente 5 minutos e centrifugados a 14000g durante 4 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um tubo eppendorf contendo 300 $\mu$ L de álcool

isopropílico. As amostras foram novamente centrifugadas a 14000g durante 1 minuto e, posteriormente, o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 300µL de etanol 70% e, em seguida, os tubos foram centrifugados a 14000g por 1 minuto. O álcool foi descartado e, após a secagem completa do tubo, o DNA foi reidratado com 50µL de água livre de nuclease. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em tubos de 200µL por meio da adição de mix contendo 5µL de Master Mix e 0,5µL de cada par de primer. Por último, são adicionados 2 µL de cada amostra de DNA (volume final: 10 µL). O ciclo utilizado para a amplificação foi: primeiro ciclo de 3 min. a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 63°C e 30s a 72°C seguidos por 10min a 72°C e a 4°C até a realização da eletroforese. Os primers utilizados para a identificação do genótipo foram: LYA1= 5' CCTGCTCGCTTCGCTACTTGGAGC 3', LYA2= 5' GTCTTGCGCCTTAAACCAACTTGG 3', RYA1= 5' CTTGAGATCGGGCGTTTCGACTCGC 3', RYA2= 5' CCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGC 3', e utilizados como controle positivo: Actina R= 5' AGCCTCAGGGCATCGGAACC 3', Actina F= 5' GGAGACGGGGTCACCCACAC 3'. O produto da amplificação foi adicionado em gel de agarose 1,5% com 10,000X Syber e visualizado em fotodocumentador ChemiDoc (Figura 6) (HOFSTETTER *et al.*, 1997).

Figura 6 - 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: Autor, 2016.

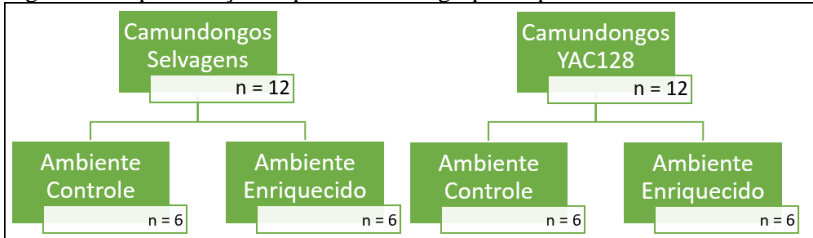
#### 4.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Aos 60 dias de idade, os animais (machos n = 11, fêmeas n = 13) foram divididos em dois grandes grupos (Figura 7):

I) Ambiente Controle (AC): camundongos YAC128 e selvagens foram mantidos em caixas opacas de plástico (41 x 34 x 16 cm), de 4 a 6 animais por caixa, sem qualquer objeto;

II) Ambiente Enriquecido (AE): camundongos YAC128 e selvagens foram mantidos em caixas opacas de plástico (41 x 34 x 16 cm), de 4 a 6 animais por caixa, com diferentes objetos de diferentes formas, tamanhos, cores e texturas, além de terem acesso a uma roda de corrida voluntária. A maioria dos objetos e suas localizações foram renovadas duas vezes na semana para garantir novidade (BOUET *et al.*, 2011).

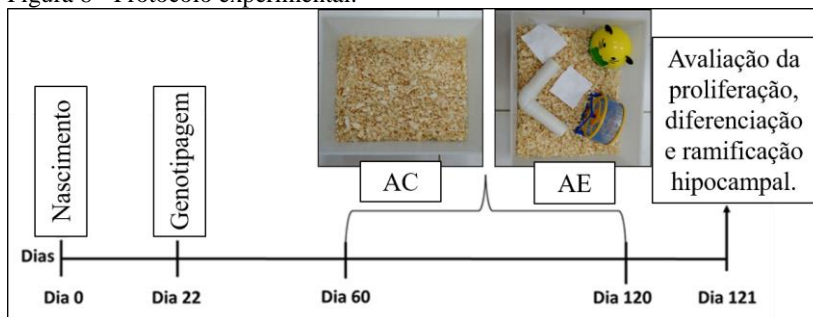
Figura 7 - Representação esquemática dos grupos experimentais.



Legenda: Os animais foram genotipados com 22 dias (desmame) e, quando completarem 60 dias de idade, os mesmos foram randomicamente divididos em 4 grupos: Camundongos Selvagens AE e AC e Camundongos YAC128 AE e AC.  
Fonte: Autor, 2016.

Os animais ficaram expostos por 60 dias consecutivos aos respectivos ambientes (Figura 8). Durante a limpeza das caixas, que era realizada semanalmente, alguns objetos não foram mudados e nem limpos, bem como uma parte do material de nidificação da caixa anterior foi colocada na caixa limpa a fim de limitar comportamentos interindividuais aversivos dos machos (VAN LOO *et al.*, 2003). Aos 120 dias de vida os animais foram eutanasiados e tiveram o tecido cerebral processado para avaliar proliferação celular, diferenciação neuronal e arborização dendrítica da ZSG do GD da formação hipocampal.

Figura 8 - Protocolo experimental.



Legenda: Linha de vida dos animais utilizados no experimento. Os animais selvagens e YAC128 ficaram expostos ao AE a partir dos 60 dias de idade até completarem 120 dias de vida. AC: Ambiente controle. AE: Ambiente enriquecido. Fonte: Autor, 2016.

## 4.5 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

### 4.5.1 Processamento do tecido cerebral

Aos 120 dias de idade, os animais foram anestesiados intraperitonealmente (i.p.) com quetamina (100 mg/Kg) e xilazina (8 mg/Kg) e perfundidos com solução salina 0,9%, seguida de paraformaldeído 4%. Os encéfalos foram removidos da calota craniana e ficaram por 12h em solução de paraformaldeído 4%, e depois foram colocados em solução de sacarose a 30%. Após a saturação, cortes seriados de 30 $\mu$ m de espessura foram feitos utilizando o vibratomo (Vibratome, Series 1000, St. Louis, MO, EUA). As fatias foram coletadas em 1/6 séries e mantidas em solução de PBS (salina tamponada de fosfato) com azida 0,5%.

### 4.5.2 Imuno-histoquímica

Para avaliar a proliferação celular na ZSG do GD da formação hipocampal realizou-se o protocolo de imuno-histoquímica para marcar as proteínas endógenas do ciclo celular Ki-67 e o PCNA. O Ki-67 é um marcador mitótico que é expresso durante todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 e M) (SCHOLZEN e GERDES, 2000), enquanto o PCNA é expresso durante todas as fases ativas do ciclo celular e durante um curto período, uma vez que as células se tornam pós-mitóticas (INO e CHIBA, 2000; CHRISTIE e CAMERON, 2006). Com o objetivo de avaliar o

comprometimento das células com a linhagem neuronal, a migração celular e ramificação dos neurônios imaturos, realizou-se o protocolo de imuno-histoquímica para o marcador endógeno DCX que está associada aos microtúbulos especificamente expressa durante a migração de neuroblastos (neurônios imaturos) (GLEESON *et al.*, 1998; COUILLARD-DESPRES *et al.*, 2001; BROWN *et al.*, 2003; COUILLARD-DESPRES *et al.*, 2005).

#### 4.5.2.1 Proliferação celular (Ki-67)

Para realizar a imuno-histoquímica para Ki-67, incubou-se uma série de fatias cerebrais em ácido cítrico 10 mM (dissolvido em PBS 0,1 M, pH = 6,0) por 10 minutos (divididos em 2 vezes de 5 minutos) a 95 °C com 20 minutos de intervalo entre elas, a fim de expor os antígenos a serem marcados. Após, as fatias foram lavadas com solução PBS 0,1M, e posteriormente estas foram incubadas com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% e metanol 10% (dissolvidos em PBS 0,1M) em temperatura ambiente, para desativação das peroxidases. Após lavagem com PBS 0,1M, o tecido foi bloqueado com solução de bloqueio a 5% (soro de cabra normal a 5% em PBS 0,1M com Triton X-100 a 0,25%) por 1 hora em temperatura ambiente e incubado com um anticorpo primário policlonal de coelho anti-Ki-67 (1:500, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), por um período de 48 horas a 4°C. As fatias foram lavadas (PBS 0,1M e Triton X-100 a 0,25%) e bloqueadas novamente (soro de cabra normal a 2% em PBS 0,1M com Triton X-100 a 0,25%) por 10 min em temperatura ambiente e então incubadas com um anticorpo secundário, IgG de cabra anti-coelho conjugado com biotina (1:200, Vector Laboratories) em solução de bloqueio a 5% à temperatura ambiente por 2 horas. Depois de lavados novamente (PBS 0,1M) os anticorpos foram visualizados utilizando um sistema complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastain ABC Elite Kit, Vector Laboratories), por 1 hora, com 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Vector Laboratories) como cromógeno, por cerca de 3 min. Após nova lavagem (PBS 0,1M) as fatias foram montadas em lâminas gelatinizadas (revestidas de gelatina 2%), posteriormente desidratadas em crescentes concentrações de etanol (50%, 70% e 100%), seguido de 5 minutos de diafanização em xilol (Synth, Diadema, SP, Brasil) e coberto com lâmina fixada com meio de montagem para microscopia Entellan (Merk, EUA).



#### 4.5.2.2 Proliferação celular (PCNA)

Para realizar a imuno-histoquímica para PCNA, incubou-se uma série de fatias cerebrais em ácido cítrico 10 mM (dissolvido em PBS 0,1 M, pH = 6,0) por 10 minutos (divididos em 2 vezes de 5 minutos) a 95 °C com 20 minutos de intervalo entre elas, a fim de expor os antígenos a serem marcados. Após, as fatias foram lavadas com solução PBS 0,1M, e posteriormente estas foram incubadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (dissolvido em PBS 0,1M) em temperatura ambiente, para desativação das peroxidases. Após lavagem com PBS 0,1M, o tecido foi bloqueado com solução de bloqueio a 5% (soro de cabra normal a 5% em PBS 0,1M com Triton X-100 a 0,25%) por 1 hora em temperatura ambiente e incubado com um anticorpo primário policlonal de coelho anti-PCNA (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), por um período de 48 horas a 4°C. As fatias foram lavadas (PBS 0,1M) e bloqueadas novamente (soro de cabra normal a 2% em PBS 0,1M) por 2 vezes de 10 min em temperatura ambiente e então incubadas com um anticorpo secundário, IgG de cabra anti-coelho conjugado com biotina (1:200, Vector Laboratories) em solução de bloqueio a 2% à temperatura ambiente por 2 horas. Depois de lavados novamente (PBS 0,1M) os anticorpos foram visualizados utilizando um sistema complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastain ABC Elite Kit, Vector Laboratories), por 1 hora, com 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Vector Laboratories) como cromógeno, por cerca de 3 min. Após nova lavagem (PBS 0,1M) as fatias foram montadas em lâminas gelatinizadas (revestidas de gelatina 2%), posteriormente desidratadas em crescentes concentrações de etanol (50%, 70% e 100%), seguido de 5 minutos de diafanização em xilol (Synth, Diadema, SP, Brasil) e coberto com lamínula fixada com meio de montagem para microscopia Entellan (Merk, EUA).

#### 4.5.2.3 Diferenciação neuronal (DCX)

Para realizar a imuno-histoquímica para DCX incubou-se uma série de fatias cerebrais com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% e metanol 10% (dissolvidos em PBS 0,1M) por 15 minutos em temperatura ambiente. Logo após a lavagem com PBS 0,1 M, o tecido foi bloqueado com solução de bloqueio a 5% (soro de cavalo normal a 5% em PBS 0,1M e Triton X-100 a 0,25%) e incubado com um anticorpo primário policlonal de cabra anti-DCX (1:400, Santa Cruz Biotechnology) por um período de 48 horas a uma temperatura de 4°C. As fatias foram lavadas (PBS 0,1M e Triton X-100 a 0,25%) e bloqueadas novamente (soro de cavalo normal a 2% em PBS

0,1M com Triton X-100 a 0,25%) por 10 min em temperatura ambiente. Em seguida, incubou-se as fatias com um anticorpo secundário IgG anti-cabra conjugado com biotina (1:200, Vector Laboratories) dissolvido em solução de bloqueio a 2% à temperatura ambiente durante 2 horas. Depois de lavados novamente (PBS 0,1M) os anticorpos foram visualizados utilizando um sistema complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastain ABC Elite Kit, Vector Laboratories), por 1 hora, com 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Vector Laboratories) como cromógeno, por cerca de 3 min. Após nova lavagem (PBS 0,1M) as fatias foram montadas em lâminas gelatinizadas (revestidas de gelatina 2%), posteriormente desidratadas em crescentes concentrações de etanol (50%, 70% e 100%), seguido de 5 minutos de diafanização em xilol (Synth, Diadema, SP, Brasil) e coberto com lamínula fixada com meio de montagem para microscopia Entellan (Merk, EUA).

#### 4.6 QUANTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

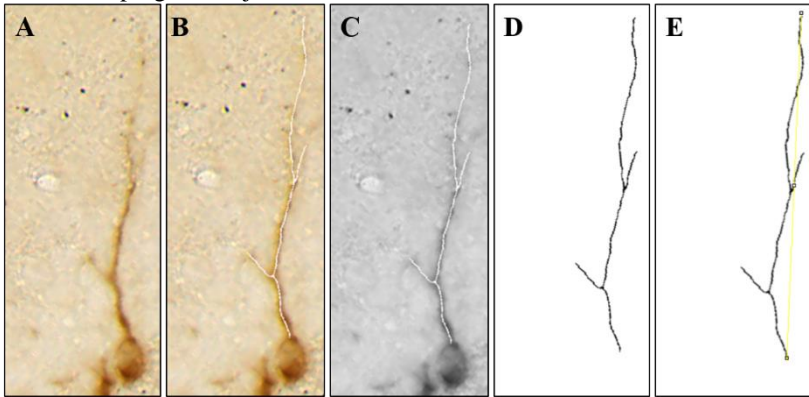
Todas as análises morfológicas foram realizadas utilizando um microscópio Olympus (Olympus BX41, Center Valley, PA, EUA) equipado com objetivas 20x e 40x. As lâminas foram identificadas por código de maneira que o experimentador estava “cego” para as condições experimentais. Todas as fatias ao longo do eixo dorso/ventral da formação hipocampal contendo o GD foram usadas para a análise, resultando em 10-14 fatias por série. Todas as células positivas para Ki-67, PCNA e DCX na ZSG de cada GD foram contadas manualmente (de Bregma 1,34 a 3,52, seis séries de cortes coronais), a porção dorsal do GD (Bregma 1,34 a 2,30, cerca de seis cortes coronais por cérebro/série) e a porção ventral do GD (Bregma 2,30 a 3,52, cerca de seis cortes coronais por cérebro/série). Os resultados foram expressos como número total de células positivas multiplicando médias aritméticas de cada formação hipocampal por 73, que é a quantidade de fatias de 30 $\mu$ m contendo a formação hipocampal no encéfalo do camundongo YAC128, para estimar o número total de células positivas em todo o GD. Para a captura de imagens foi utilizado o escaneador de lâminas ZEISS Axio Scan.Z1 (Jena, Turíngia, Alemanha), equipado com objetivas de 2,5x, 10x, 20x e 40x, com auxílio do programa ZEN Wildfield 2012 Blue Edition.

#### 4.7 ANÁLISE DE SHOLL

Com o intuito de analisar a arborização dendrítica dos neurônios imaturos do GD da formação hipocampal foi realizada a análise de Sholl

(Sholl, 1953), a partir das fatias cerebrais marcadas para a DCX. A análise de Sholl descreve o padrão de ramificação dos dendritos e axônios plotando o número de ramos em função da distância a partir de um local definido, geralmente o soma célula. As fatias foram escaneadas utilizando o escaneador de lâminas ZEISS Axio Scan.Z1, com objetiva de 20x, com auxílio do programa ZEN Wildfield 2012 Blue Edition. Em resumo, cinco fatias contendo a região dorsal da formação hipocampal e cinco fatias contendo a região ventral da formação hipocampal foram selecionadas aleatoriamente de cada animal de cada um dos grupos experimentais. De cada fatia selecionou-se a célula com menor sobreposição com outras células e com maior número de ramificações dendríticas visíveis. Este processo resultou em cinco células DCX-positivas a partir da formação hipocampal dorsal e cinco da formação hipocampal ventral de cada animal experimental. Consequentemente, este processo resultou num total de 60 células por grupo experimental, com as quais foi gerado um valor médio por animal. As lâminas e imagens foram identificadas por código de maneira que o experimentador estava “cego” para as condições experimentais. A análise de Sholl foi feita através do programa Fiji (Schindelin et al., 2012, criado a partir do programa de código aberto ImageJ (Rueden, C. T., 2017), utilizando o plugin Sholl Analysis (Ferreira et al., 2014). Este plugin automatiza a análise de Sholl em neurônios, diretamente em imagens 2D e 3D de células marcadas e isoladas, obtidas tanto em microscopia de campo claro como fluorescência. Seu algoritmo interno cria uma série de circunferências (2D) ou esferas (3D) concêntricas ao redor da soma do neurônio e conta quantas vezes os prolongamentos do neurônio cruzam com estas. Em suma, nas imagens bidimensionais de cada neurônio, a ramificação dendrítica visível foi marcada em branco através da ferramenta “pencil” com um raio de 1 pixel, 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 9). 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 Sholl Analysis, considerando circunferências concêntricas com incrementos de 2 $\mu$ m do início até o fim da reta marcada. Para a avaliação da arborização dos neurônios imaturos foram analisadas as seguintes características: número de intersecções por raio, soma das intersecções por neurônio e a distância máxima do soma até o final dos dendritos.

Figura 9 - Resumo da transformação da fotografia de um neurônio para análise de Sholl no programa Fiji.



Legenda: Transformação das fotos até a execução da análise de Sholl. A – Foto de um neurônio marcado com DCX (zoom de 200x). B – Ramificação traçada com a ferramenta lápis e convertida em preto e branco (C). D – Marcação do traçado da ramificação dendrítica em preto e branco e utilizada a ferramenta régua para determinar o local da análise de Sholl (E).

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram analisados quanto a sua normalidade, utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnof. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 13 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA). Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias para genótipo (selvagem x YAC128) e ambiente (controle x enriquecido), seguida do teste *post hoc* de comparação múltiplas entre as médias de Fisher LSD (diferença mínima significativa, do inglês least significant difference). Para os dados de intersecção dendrítica por raio da análise de Sholl, foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de *post hoc* de Fisher LSD. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) e foram considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EFEITO DO AE SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR HIPOCAMPAL

Com o intuito de avaliar o efeito do AE sobre a proliferação celular na ZSG do GD da formação hipocampal dos camundongos selvagens e YAC128 foram realizadas imuno-histoquímicas para os marcadores endógenos Ki-67 (Figura 10) e PCNA (Figura 11).

#### 5.1.1 Efeito do AE Sobre a Expressão do Marcador de Proliferação Celular Ki-67 na ZSG do GD da Formação Hipocampal

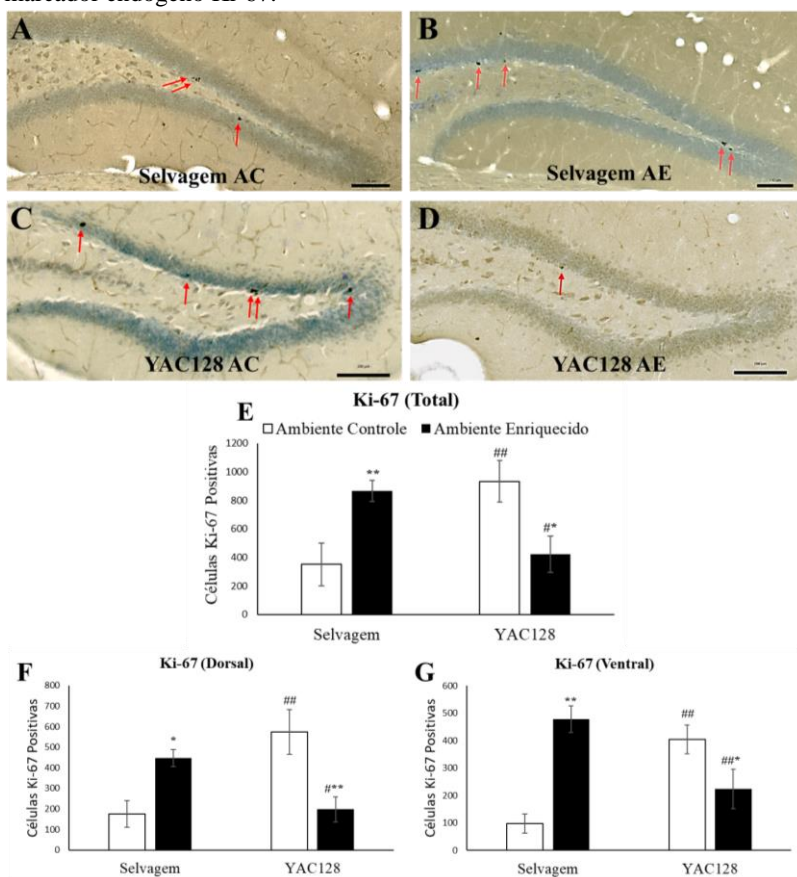
A proliferação celular foi avaliada através da quantificação das células Ki-67 positivas ao longo da ZSG do GD da formação hipocampal. A ANOVA de duas vias revelou que houve uma interação entre os dois fatores [ $F(1, 20) = 16,29$ ;  $p < 0,01$ ]. Porém, nem o ambiente [ $F(1, 20) = 0,0002$ ;  $p = 0,99$ ] ou o genótipo [ $F(1, 20) = 0,29$ ;  $p = 0,59$ ] causaram diferença significativa no número de células Ki-67 positivas na ZSG do GD da formação hipocampal (Figura 10 E). O teste *post hoc* de Fisher LSD revelou que no AC o número de células Ki-67 positivas nos camundongos YAC128 é maior do que nos camundongos selvagens ( $p < 0,01$ ). No entanto, no AE os camundongos YAC128 apresentaram menos células Ki-67 positivas do que os camundongos selvagens ( $p < 0,05$ ). O efeito do AE nos camundongos selvagens foi de aumento das células Ki-67 positivas ( $p < 0,05$ ) e nos camundongos YAC128 foi de diminuição ( $p < 0,05$ ).

As porções dorsal e ventral da formação hipocampal foram também avaliadas separadamente. A ANOVA de duas vias demonstrou que houve um efeito da interação entre ambiente e genótipo [ $F(1, 20) = 19,69$ ;  $p < 0,01$ ]. Porém não houve efeito do ambiente [ $F(1, 20) = 0,50$ ;  $p = 0,48$ ] ou do genótipo [ $F(1, 20) = 1,04$ ;  $p = 0,32$ ] no número de células Ki-67 positivas na ZSG do GD da porção dorsal da formação hipocampal. O teste *post hoc* de Fisher LSD revelou que o número de células Ki-67 positivas nos camundongos YAC128 expostos ao AC é significativamente maior do que nos camundongos selvagens expostos ao AC ( $p < 0,01$ ). Além disso, os camundongos YAC128 expostos ao AE apresentaram significativamente menos células Ki-67 positivas do que os camundongos selvagens no mesmo ambiente ( $p < 0,05$ ). O efeito do AE nos camundongos selvagens foi de aumento das células Ki-67 positivas

( $p < 0,05$ ) e nos camundongos YAC128 foi de diminuição ( $p < 0,01$ ). (Figura 10 F).

Na porção ventral da ZSG do GD da formação hipocampal a ANOVA de duas vias revelou que houve uma interação entre ambiente e genótipo [ $F(1, 19) = 25,86$ ;  $p < 0,01$ ]. No entanto, nem o ambiente [ $F(1, 19) = 3,31$ ;  $p = 0,08$ ] ou o genótipo [ $F(1, 19) = 0,23$ ;  $p = 0,63$ ] alteraram o número de células Ki-67 positivas. O teste *post hoc* de Fisher LSD revelou que no AC o número de células Ki-67 positivas nos camundongos YAC128 é maior do que nos camundongos selvagens ( $p < 0,01$ ). No entanto, no AE os camundongos YAC128 apresentaram menos células Ki-67 positivas do que os camundongos selvagens ( $p < 0,01$ ). O efeito do AE nos camundongos selvagens foi de aumento das células Ki-67 positivas ( $p < 0,01$ ) e nos camundongos YAC128 foi de diminuição ( $p < 0,05$ ) (Figura 10 G).

Figura 10 - Avaliação dos efeitos do AE sobre a proliferação celular na ZSG do GD da formação hipocampal de camundongos selvagens e YAC128 utilizando o marcador endógeno Ki-67.



Legenda: Efeitos do AE em camundongos selvagens e YAC128 sobre a proliferação celular na ZSG do GD da formação hipocampal avaliado por imunohistoquímica para Ki-67. Fotomicrografias representativas da expressão do marcador de proliferação celular endógeno Ki-67 na ZSG do GD da formação hipocampal de camundongos selvagens e YAC128 expostos ao AC (A e C respectivamente) e ao AE (B e D respectivamente) avaliados por imunohistoquímica. (Barra de escala = 100 $\mu$ m). E) Células Ki-67 positivas na ZSG de todo o GD da formação hipocampal, F) células Ki-67 positivas na porção dorsal e G) na porção ventral da formação hipocampal. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  E.P.M. (n = 5-6 animais). \* p < 0,05 e \*\* p < 0,01 em comparação com o grupo exposto ao AC; #p < 0,05 e ##p < 0,01, em comparação com o grupo selvagem respectivo.

### **5.1.2 Efeito do AE Sobre a Expressão do Marcador de Proliferação Celular PCNA na ZSG do GD da Formação Hipocampal**

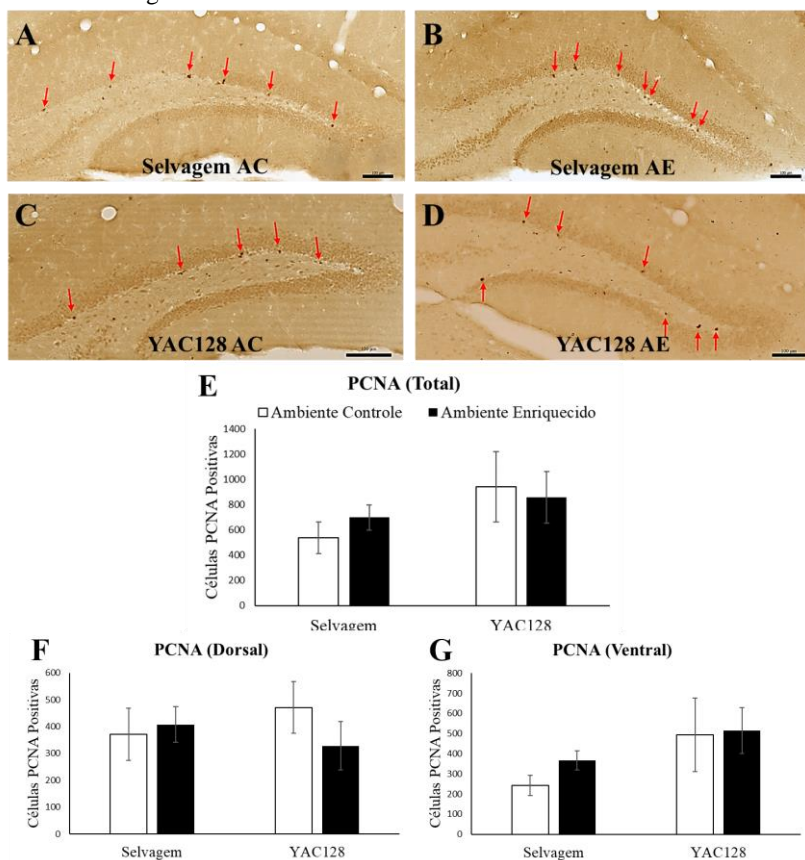
A proliferação celular também foi avaliada por meio da quantificação das células PCNA positivas ao longo da ZSG do GD da formação hipocampal. A ANOVA de duas vias revelou que não houve efeito do ambiente [ $F(1, 19) = 0,05$ ;  $p = 0,84$ ], nem do genótipo [ $F(1, 19) = 2,06$ ;  $p = 0,18$ ] e nem houve interação entre o ambiente e o genótipo [ $F(1, 19) = 0,39$ ;  $p = 0,54$ ] no número de células PCNA positivas na ZSG do GD da formação hipocampal (Figura 11 E).

As porções dorsal e ventral da formação hipocampal também foram avaliadas separadamente. A ANOVA de duas vias revelou que não houve efeito do ambiente [ $F(1, 20) = 0,36$ ;  $p = 0,55$ ], genótipo [ $F(1, 20) = 0,01$ ;  $p = 0,91$ ] ou interação entre ambiente e genótipo [ $F(1, 20) = 1,04$ ;  $p = 0,32$ ] no número de células PCNA positivas na ZSG do GD na porção dorsal da formação hipocampal (Figura 11 F).

Na porção ventral da formação hipocampal a ANOVA de duas vias revelou que não houve efeito do ambiente [ $F(1, 19) = 0,38$ ;  $p = 0,54$ ] nem do genótipo [ $F(1, 19) = 2,89$ ;  $p = 0,11$ ], ou interação entre os ambiente e genótipo [ $F(1, 19) = 0,19$ ;  $p = 0,69$ ] no número de células PCNA positivas na ZSG do GD (Figura 11 G).



Figura 11 - Avaliação dos efeitos do AE sobre a proliferação celular na ZSG do GD da formação hipocampal de camundongos selvagens e YAC128 utilizando o marcador endógeno PCNA.



Legenda: Efeitos do AE em camundongos selvagens e YAC128 sobre a proliferação celular na ZSG do GD da formação hipocampal avaliado por imunohistoquímica para PCNA. Fotomicrografias representativas da expressão do marcador de proliferação celular endógeno PCNA na ZSG do GD da formação hipocampal de camundongos selvagens e YAC128 expostos ao AC (A e C respectivamente) e ao AE (B e D respectivamente) avaliados por imunohistoquímica. (Barra de escala = 100 $\mu$ m). E) Células PCNA positivas na ZSG de todo o GD da formação hipocampal, F) células PCNA positivas na porção dorsal e G) na porção ventral da formação hipocampal. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  E.P.M. (n = 5-6 animais). Não houve diferença significativa entre os grupos considerando  $p < 0,05$ .

## 5.2 EFEITO DO AE SOBRE A DIFERENCIAÇÃO NEURONAL HIPOCAMPAL

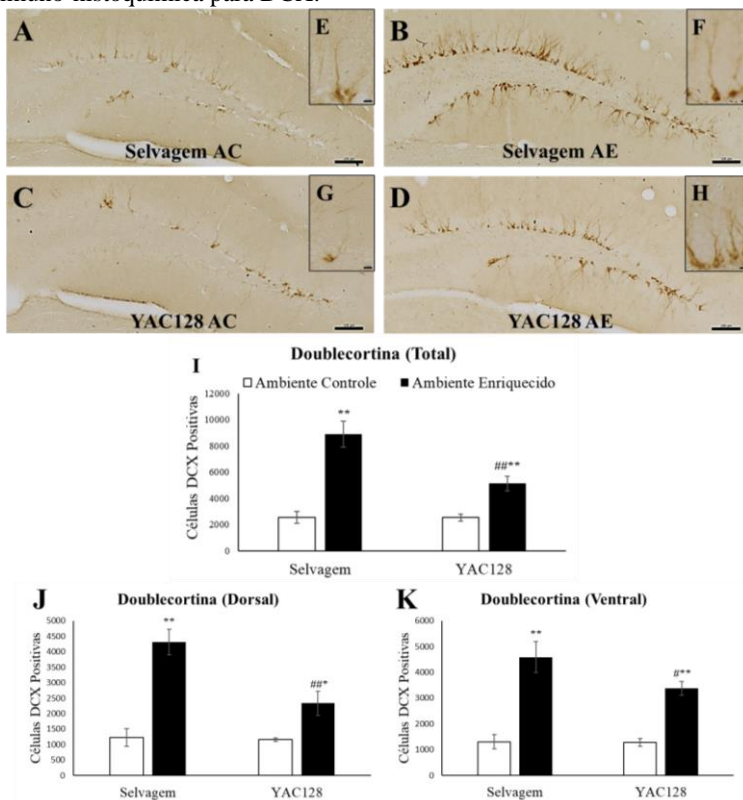
Com a finalidade de avaliar o efeito do AE sobre a diferenciação neuronal nos camundongos selvagens e YAC128 foi realizada imunohistoquímica para o marcador endógeno DCX e quantificação das células DCX positivas ao longo da ZSG do GD da formação hipocampal (Figura 12). A ANOVA de duas vias revelou que houve efeito do ambiente [F (1, 19) = 48,34;  $p < 0,01$ ], do genótipo [F (1,19) = 8,62;  $p = 0,01$ ] e interação entre ambiente e genótipo [F (1, 19) = 8,53;  $p = 0,01$ ] no número de células DCX positivas na ZSG do GD da formação hipocampal. O teste *post hoc* de Fisher LSD revelou que embora não houve diferença significativa entre os camundongos YAC128 e selvagens expostos ao AC a exposição ao AE aumentou o número das células DCX positivas tanto em camundongos selvagens ( $p < 0,01$ ) quanto em camundongos YAC128 ( $p < 0,01$ ) (Figura 12 I).

As porções dorsal e ventral da formação hipocampal também foram avaliadas separadamente. A ANOVA de duas vias revelou que houve efeito do ambiente [F (1, 18) = 39,19;  $p = 0,00$ ], do genótipo [F (1, 18) = 9,06;  $p = 0,01$ ] e houve interação entre ambiente e genótipo [F (1, 18) = 7,84;  $p = 0,01$ ] no número de células DCX positivas na ZSG do GD da porção dorsal da formação hipocampal. O teste *post hoc* de Fisher LSD revelou que não houve diferença significativa entre os camundongos YAC128 e selvagens expostos ao AC. Por outro lado, os camundongos YAC128 expostos ao AE apresentaram número de células DCX positivas significativamente menor do que os camundongos selvagens expostos ao AE ( $p < 0,01$ ). Além disso, se observou que o efeito do AE foi de aumento das células DCX positivas tanto em camundongos selvagens ( $p < 0,01$ ) quanto em camundongos YAC128 ( $p < 0,05$ ) (Figura 12 J).

Na porção ventral da formação hipocampal a ANOVA de duas vias revelou que houve efeito do ambiente [F (1, 19) = 51,48;  $p < 0,01$ ], mas não houve efeito do genótipo [F (1, 19) = 2,71;  $p = 0,12$ ] ou da interação entre ambiente e genótipo [F (1, 19) = 2,44;  $p = 0,13$ ] no número de células DCX positivas na ZSG do GD da formação hipocampal. O teste *post hoc* de Fisher LSD revelou que não houve diferença significativa entre os camundongos YAC128 e selvagens expostos ao AC. Por outro lado, os camundongos YAC128 expostos ao AE apresentaram número de células DCX positivas significativamente menor do que os camundongos selvagens expostos ao AE ( $p < 0,05$ ). Além disso, se observou que o efeito do AE foi de aumento das células DCX positivas tanto em camundongos

selvagens ( $p < 0,01$ ) quanto em camundongos YAC128 ( $p < 0,01$ ) (Figura 12 K).

Figura 12 - Avaliação dos efeitos do AE sobre a diferenciação neuronal na ZSG do GD da formação hipocampal de camundongos selvagens e YAC128, através de imuno-histoquímica para DCX.



Legenda: Efeitos do AE em camundongos selvagens e YAC128 sobre a diferenciação neuronal. Fotomicrografias representativas de células DCX positivas na ZSG do GD da formação hipocampal de camundongos selvagens e YAC128 expostos ao AC (A e C) e ao AE (B e D). (Barra de escala = 100 $\mu$ m). Fotomicrografias representativas de neurônios imaturos marcados para DCX na ZSG do GD da formação hipocampal de camundongos selvagens e YAC128 expostos ao AC (E e G) e ao AE (F e H). (Barra de escala = 10 $\mu$ m). I) Células DCX positivas na ZSG de todo o GD da formação hipocampal, J) Células DCX positivas na porção dorsal e K) na porção ventral da formação hipocampal. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  E.P.M. (n = 5-6 animais). \*  $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  em comparação com o grupo exposto ao AC; # $p < 0,05$  e ### $p < 0,01$ , em comparação com o grupo selvagem respectivo.

### 5.3 EFEITO DO AE SOBRE A ARBORIZAÇÃO DENDRÍTICA HIPOCAMPAL

Para avaliar o efeito do AE sobre a ramificação dendrítica em neurônios imaturos da ZSG do GD da formação hipocampal dos camundongos selvagens e YAC128 foi realizada a análise de Sholl em amostras marcadas para proteína DCX. Foram analisadas as seguintes características: distância máxima do soma até o final dos dendritos (Figura 13), soma das intersecções por neurônio (Figura 14) e o número de intersecções por raio (Figura 15).

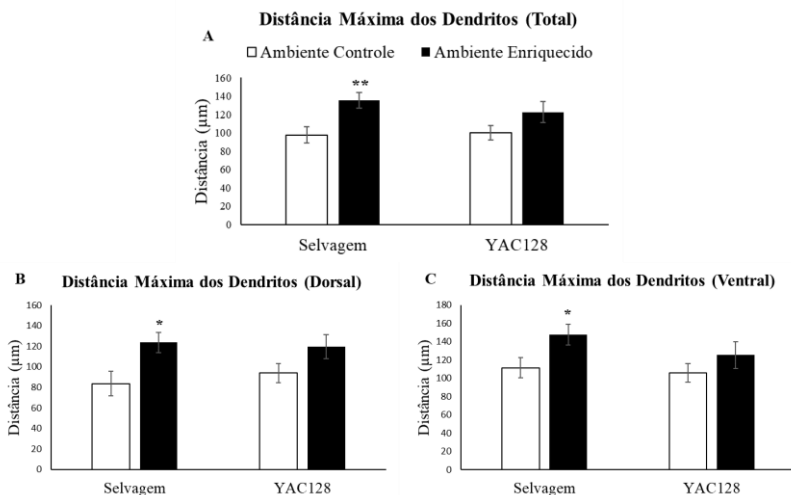
A ANOVA de duas vias revelou que houve efeito do ambiente [F (1, 20) = 10,82;  $p < 0,01$ ], mas não houve efeito do genótipo [F (1, 20) = 0,34;  $p = 0,57$ ] ou interação entre genótipo e ambiente [F (1, 20) = 0,72;  $p = 0,41$ ] na distância máxima alcançada pelos dendritos dos neurônios imaturos da ZSG do GD da formação hipocampal. O teste *post hoc* de Fisher LSD revelou que não houve diferença significativa entre os camundongos YAC128 e selvagens expostos ao AC e entre os camundongos YAC128 e selvagens expostos ao AE. No entanto, se observou que o efeito do AE aumentou significativamente a distância alcançada pelos dendritos dos camundongos selvagens ( $p < 0,01$ ), mas não causou diferença nos camundongos YAC128 (Figura 13 A).

Esse mesmo aspecto foi avaliado separadamente para as regiões dorsal e ventral da formação hipocampal. A ANOVA de duas vias revelou que houve efeito do ambiente [F (1, 20) = 9,39;  $p < 0,01$ ], mas não houve efeito do genótipo [F (1, 20) = 0,08;  $p = 0,78$ ], nem houve interação entre genótipo e ambiente [F (1, 20) = 0,44;  $p = 0,52$ ] na distância máxima dos dendritos da ZSG do GD da porção dorsal da formação hipocampal. O teste *post hoc* de Fisher LSD revelou que não houve diferença significativa entre os camundongos YAC128 e selvagens expostos ao AC e entre os camundongos YAC128 e selvagens expostos ao AE. Além disso, se observou que o efeito do AE aumentou significativamente a distância alcançada pelos dendritos dos camundongos selvagens ( $p < 0,05$ ), mas não causou diferença nos camundongos YAC128 (Figura 13 B).

Na avaliação da porção ventral da formação hipocampal a ANOVA de duas vias revelou que houve efeito do ambiente [F (1, 20) = 5,46;  $p < 0,05$ ], mas não houve efeito do genótipo [F (1, 20) = 1,36;  $p = 0,26$ ], nem da interação entre genótipo e ambiente [F (1, 20) = 0,51;  $p = 0,48$ ] na distância máxima alcançada pelos dendritos da ZSG do GD. O teste *post hoc* de Fisher LSD revelou que não houve diferença significativa entre os camundongos YAC128 e selvagens expostos ao AC

e entre os camundongos YAC128 e selvagens expostos ao AE. Além disso, se observou que o efeito do AE aumentou significativamente a distância alcançada pelos dendritos dos camundongos selvagens ( $p < 0,05$ ), mas não causou diferença nos camundongos YAC128 (Figura 13 C).

Figura 13 - Avaliação dos efeitos do AE sobre a arborização dendrítica na ZSG do GD da formação hipocampal de camundongos selvagens e YAC128, através da distância máxima alcançada pelos dendritos.



Legenda: Efeitos do AE em camundongos selvagens e YAC128 sobre a arborização dendrítica na ZSG do GD da formação hipocampal avaliado pela distância máxima alcançada pelos dendritos a partir do soma. A) Distância máxima alcançada pelos dendritos na ZSG de todo o GD da formação hipocampal, B) distância máxima alcançada pelos dendritos na porção dorsal e C) na porção ventral da formação hipocampal. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  E.P.M. ( $n = 6$  animais). \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  em comparação com o grupo exposto ao AC.

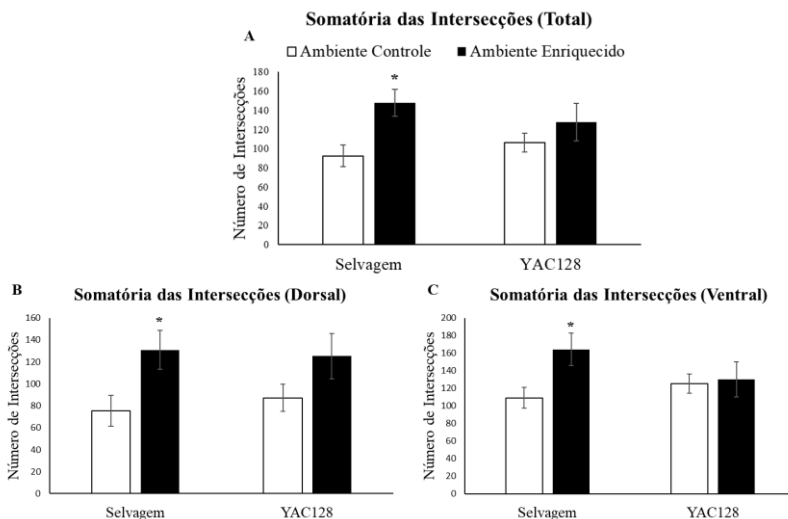
Outro aspecto avaliado da ramificação dendrítica foi a somatória das intersecções (da análise de Sholl) dos neurônios imaturos da ZSG do GD da formação hipocampal. A ANOVA de duas vias revelou que houve efeito do ambiente [ $F(1, 20) = 7,38$ ;  $p < 0,01$ ], mas não do genótipo [ $F(1, 20) = 0,04$ ;  $p = 0,84$ ], nem houve interação entre o ambiente e o genótipo [ $F(1, 20) = 1,42$ ;  $p = 0,25$ ] na somatória de intersecções. O teste *post hoc* de Fisher LSD revelou que não houve diferença significativa entre os camundongos YAC128 e selvagens expostos ao AC e entre os

camundongos YAC128 e selvagens expostos ao AE. No entanto, se observou que o AE aumentou o número de intersecções nos neurônios imaturos em camundongos selvagens ( $p < 0,05$ ), mas não causou diferença nos camundongos YAC128 (Figura 14 A).

As porções dorsal e ventral da formação hipocampal também foram avaliadas separadamente. A ANOVA de duas vias revelou que houve efeito do ambiente [ $F(1, 20) = 8,05$ ;  $p < 0,01$ ], mas não houve efeito do genótipo [ $F(1, 20) = 0,03$ ;  $p = 0,85$ ], nem da interação entre o genótipo e ambiente [ $F(1, 20) = 0,27$ ;  $p = 0,61$ ] na somatória das intersecções dos neurônios imaturos da ZSG do GD da porção dorsal da formação hipocampal. O teste *post hoc* de Fisher LSD revelou que não houve diferença significativa entre os camundongos YAC128 e selvagens expostos ao AC e entre os camundongos YAC128 e selvagens expostos ao AE. No entanto, se observou que o AE aumentou o número de intersecções nos neurônios imaturos em camundongos selvagens ( $p < 0,05$ ), mas não causou diferença nos camundongos YAC128 (Figura 14 B).

Na avaliação da porção ventral da formação hipocampal a ANOVA de duas vias revelou que não houve efeito do ambiente [ $F(1, 20) = 3,58$ ;  $p = 0,07$ ], do genótipo [ $F(1, 20) = 0,32$ ;  $p = 0,58$ ], ou da interação entre ambiente e genótipo [ $F(1, 20) = 2,516$ ;  $p = 0,13$ ] na somatória das intersecções dos neurônios imaturos da ZSG do GD da formação hipocampal. O teste *post hoc* de Fisher LSD revelou que não houve diferença significativa entre os camundongos YAC128 e selvagens expostos ao AC e entre os camundongos YAC128 e selvagens expostos ao AE. No entanto, se observou que o AE aumentou o número de intersecções nos neurônios imaturos em camundongos selvagens ( $p < 0,05$ ), mas não causou diferença nos camundongos YAC128 (Figura 14 C).

Figura 14 - Avaliação dos efeitos do AE sobre a arborização dendrítica na ZSG do GD da formação hipocampal de camundongos selvagens e YAC128, através da somatória das intersecções da análise de Sholl.



Legenda: Efeitos do AE em camundongos selvagens e YAC128 sobre a arborização dendrítica na ZSG do GD da formação hipocampal avaliado pela somatória das intersecções da análise de Sholl. A) Somatória das intersecções na ZSG de todo o GD da formação hipocampal, B) somatória das intersecções na porção dorsal e C) na porção ventral da formação hipocampal. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  E.P.M. (n = 6 animais). \*  $p < 0,05$  em comparação com o grupo exposto ao AC.

Por fim, a complexidade da arborização dendrítica dos neurônios imaturos da ZSG do GD da formação hipocampal foi avaliada contando-se o número de intersecções por raio na análise de Sholl. A ANOVA de medidas repetidas revelou um efeito do ambiente [ $F(126, 2520) = 4,92$ ;  $p < 0,01$ ] e da interação entre o ambiente e o genótipo [ $F(126, 2520) = 1,52$ ;  $p < 0,01$ ], mas não do genótipo [ $F(126, 2520) = 0,24$ ;  $p = 1,00$ ] no número de intersecções por raio. Por outro lado, o teste *post hoc* de Fisher LSD revelou que não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 15 A).

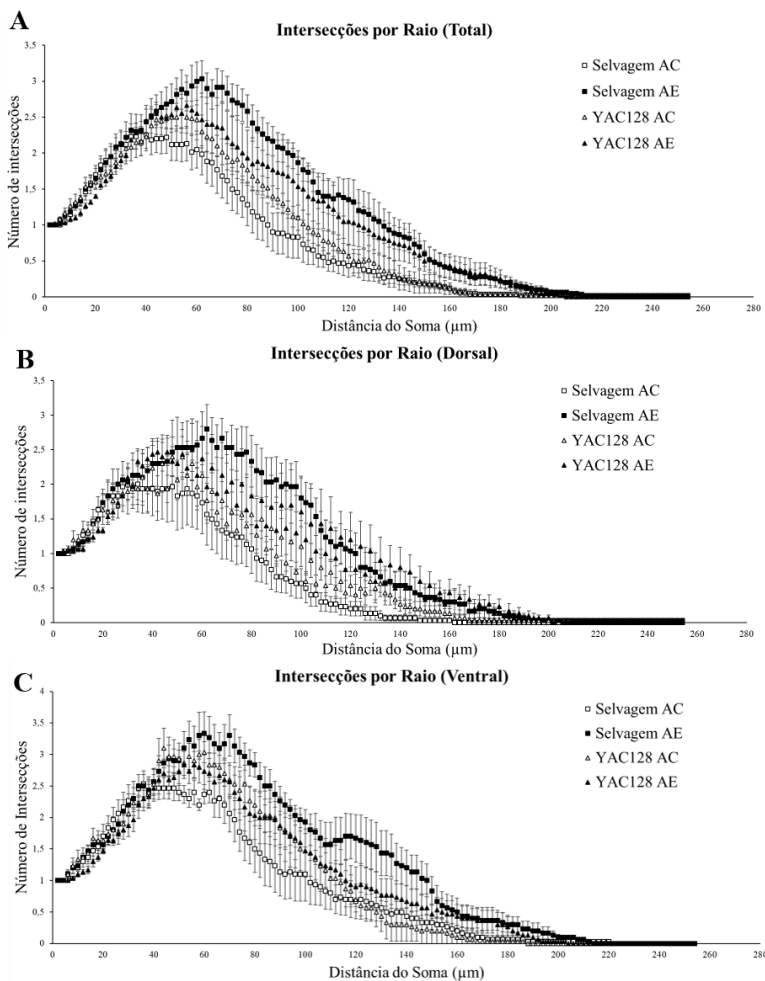
Esse mesmo aspecto foi avaliado separadamente para as regiões dorsal e ventral da formação hipocampal. A ANOVA de medidas repetidas revelou que houve efeito do ambiente [ $F(126, 2520) = 2,94$ ;  $p < 0,01$ ], mas não do genótipo [ $F(126, 2520) = 0,54$ ;  $p = 1,00$ ] ou da interação entre genótipo e ambiente [ $F(126, 2520) = 0,83$ ;  $p = 0,92$ ] no

número de intersecções por raio nos neurônios imaturos da ZSG do GD da porção dorsal da formação hipocampal. O teste *post hoc* de Fisher LSD revelou que não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 15 B).

Na porção ventral da formação hipocampal a ANOVA de medidas repetidas revelou que houve efeito do ambiente [F (126, 2520) = 2,27;  $p < 0,01$ ] e da interação entre o ambiente e o genótipo [F (126, 2520) = 1,94;  $p < 0,01$ ], mas não houve efeito do genótipo [F (126, 2520) = 0,72;  $p = 0,99$ ] no número de intersecções por raio de neurônios imaturos da ZSG do GD. O teste *post hoc* de Fisher LSD revelou que não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 15 C).



Figura 15 - Avaliação dos efeitos do AE sobre a arborização dendrítica na ZSG do GD da formação hipocampal de camundongos selvagens e YAC128, através do número de intersecções por raio.



Legenda: Efeitos do AE em camundongos selvagens e YAC128 sobre a arborização dendrítica na ZSG do GD da formação hipocampal avaliado pelo número de intersecções por raio. A) Número de intersecções por raio nos neurônios imaturos da ZSG de todo o GD da formação hipocampal, B) número de intersecções por raio na porção dorsal e C) na porção ventral da formação hipocampal. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  E.P.M. ( $n = 6$  animais). Não houve diferença significativa entre os grupos considerando  $p < 0,05$ . AC = Ambiente Controle, AE = Ambiente Enriquecido.



## 6 DISCUSSÃO

A DH é uma doença progressiva e devastadora para os pacientes e para suas famílias, caracterizada por uma variedade de sintomas motores, cognitivos e psiquiátricos que tipicamente surgem na idade adulta e que ainda não tem cura. Seu tratamento se baseia em amenizar os sintomas e por isso as pesquisas continuam visando a cura ou pelo menos a melhora na qualidade de vida dos pacientes (SAUDOU e HUMBERT, 2016; GARCIA-GORRO *et al.*, 2017; MCCOLGAN e TABRIZI, 2017). Os sintomas da DH são atribuídos principalmente a morte de neurônios estriatais, corticais e hipocampais. É consenso que a formação hipocampal é uma estrutura chave do sistema límbico, que tem sido intensamente investigada como mediadora da aprendizagem e da memória (SQUIRE, 1992) e que manifesta fortemente a propriedade de neuroplasticidade através da neurogênese (ALTMAN e DAS, 1965). O prejuízo dessa propriedade é considerado uma das razões do desenvolvimento do comportamento depressivo (PITTENGER e DUMAN, 2008). O comprometimento cognitivo e a depressão estão no espectro de sintomas que atingem os pacientes com DH (PHILLIPS *et al.*, 2008). Portanto estudar detalhadamente a neurogênese na DH pode colaborar para elucidação dos mecanismos que levam a patologia e, graças ao desenvolvimento de modelos animais que mimetizam características fenotípicas ou genotípicas da doença, estes estudos têm aumentado. Dentre os modelos genéticos utilizados para estudar a DH o YAC128 é um modelo bem apropriado 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 apresentam uma progressão lenta dos sintomas de modo similar aos humanos (VAN RAAMSDONK *et al.*, 2005).

A neurogênese hipocampal adulta é um processo de múltiplos estágios altamente regulados envolvendo a proliferação de células tronco/precursoras neuronais, diferenciação e migração neuronal e, finalmente, maturação neuronal e integração no circuito do hipocampo existente. Diversos fatores afetam essas etapas regulatórias, um deles é o AE. Vários estudos descrevem que o AE aumenta a gênese de novos neurônios no GD, aumentando também a sobrevivência destas novas células (KEMPERMANN *et al.*, 1997; KEMPERMANN, Gerd *et al.*,

1998; VAN PRAAG *et al.*, 1999). Adicionalmente o AE é capaz de modificar o comportamento de roedores aumentando a habituação em tarefas de exploração do campo aberto (AMARAL *et al.*, 2008), diminuindo o tempo de exploração em tarefas de reconhecimento de objetos (VIOLA *et al.*, 2010) e melhorando o desempenho no teste do labirinto aquático de Morris e no teste do labirinto radial (LEGGIO *et al.*, 2005), por exemplo. Isso ocorre, porque o provimento de complexidade ambiental com objetos de enriquecimento oferece uma série de oportunidades para estimulação visual, somatossensorial e olfativa. O aspecto de novidade ambiental, alcançada através da mudança dos objetos e da posição dos objetos no AE, pode proporcionar aumento da estimulação cognitiva em relação à formação de mapas espaciais (NITHIANANTHARAJAH e HANNAN, 2006).

Embora a DH seja uma doença genética existem evidências de que a idade de início dos sintomas pode ser modulada por fatores ambientais em modelos animais (VAN DELLEN *et al.*, 2000) e em seres humanos (WEXLER *et al.*, 2004). Acredita-se que a idade do início dos sintomas, é afetada por outros fatores, além da quantidade de repetições de CAG e destes outros fatores, 60% são ambientais (WEXLER *et al.*, 2004). Dentro desta perspectiva, neste estudo avaliou-se como o AE poderia afetar a neuroplasticidade hipocampal no modelo animal YAC128 de DH. Para isso foram avaliadas as fases da neurogênese de proliferação celular e diferenciação neuronal hipocampal, bem como, a arborização dendrítica dos neurônios imaturos.

Para avaliar os efeitos do AE na proliferação celular, foi utilizado um protocolo de imuno-histoquímica para marcadores endógenos de células em proliferação: PCNA e Ki-67. Neste trabalho os experimentos demonstraram que os camundongos selvagens que foram expostos por 2 meses ao AE apresentaram um aumento na proliferação celular (ki-67) da ZSG, corroborando com dados da literatura que demonstram que o AE aumenta a proliferação em outras linhagens de camundongos. Nossos achados também mostram que o número de células Ki-67 positivas em camundongos YAC128 é maior do que nos camundongos selvagens. Esses resultados são contrários a estudos prévios que demonstram que a proliferação celular está diminuída em modelos animais da DH (LAZIC *et al.*, 2004; LAZIC *et al.*, 2006), inclusive no modelo YAC128 (SIMPSON *et al.*, 2011). O estudo de Simpson e colaboradores (2011) analisou o camundongo YAC128 em diferentes idades e encontrou redução no número de células Ki-67 positivas, em comparação com camundongos selvagens, aos 3, 12 e 18 meses de idade, mas não aos 9 meses. Por outro lado, alguns estudos revelaram um aumento da

proliferação e neurogênese na camada subependimal adjacente ao núcleo caudado no cérebro de pessoas com DH (CURTIS *et al.*, 2003; CURTIS *et al.*, 2005). Além disso, modelos químicos de DH com injeção de ácido quinolínico apresentam proliferação aumentada na zona subventricular e novos neurônios foram observados no estriado (TATTERSFIELD *et al.*, 2004). Esse aumento de proliferação pode fazer parte de um mecanismo compensatório do SNC na tentativa de diminuir os danos causados pela DH assim como ocorre em outras patologias coma na doença de Alzheimer (JIN *et al.*, 2004) ou em acidente vascular encefálico (ARVIDSSON *et al.*, 2002; JIN *et al.*, 2006). Outra hipótese para explicar o aumento de células Ki-67 positivas nos camundongos YAC128 seria o aumento de divisões simétricas em detrimento das divisões assimétricas das células precursoras neurais. Uma futura análise de células marcadas para GFAP na ZSG do GD poderia confirmar essa hipótese.

Curiosamente, o AE diminuiu o número de células Ki-67 positivas nos camundongos YAC128 e esse padrão se repetiu também quando considerado separadamente a regiões dorsal e ventral da formação hipocampal. Esses resultados são contrários a muitos estudos que demonstram o aumento da proliferação celular pelo AE, inclusive em modelos de DH com R6/1 (VAN PRAAG *et al.*, 1999; LAZIC *et al.*, 2004; LAZIC *et al.*, 2006). Contudo, o trabalho de Schaefers (2015) sugere que o córtex pré-frontal (CPF) pode desempenhar um papel na regulação da proliferação celular hipocampal, sendo que a ativação do CPF pelo AE ou por uma tarefa de memória de trabalho diminui taxas de proliferação celular previamente aumentadas por atividade física em roda de correr em camundongos CD1 (SCHAEFERS, 2015). Neste sentido, vale ressaltar que a proliferação celular basal estava aumentada nos camundongos YAC128 e que uma modulação da proliferação pelo CPF pode ser uma possível explicação para a diminuição da proliferação celular hipocampal observada nos camundongos YAC128 expostos ao AE. Entretanto, não encontramos outros estudos, que avaliaram os efeitos do AE sobre a proliferação celular hipocampal especificamente no camundongo YAC128. Sendo assim, se faz importante a realização de outros trabalhos que façam esta avaliação a fim confirmar nossos achados.

Em contrapartida, não houve efeito do genótipo ou do tratamento na proliferação celular quando analisadas as células marcadas positivamente para PCNA. O resultado foi semelhante considerando as regiões dorsal e ventral da formação hipocampal separadamente. Esses dados são semelhantes aos descritos na literatura, por exemplo, o estudo de Simpson *et al.*, (2011) demonstrou que camundongos selvagens e

YAC128 não possuem diferenças significativas no número de células PCNA positivas. Além disso, Low *et al.*, (2011) demonstraram que não há diferença na proliferação celular hipocampal, observada através da marcação para PCNA, em tecidos *post-mortem* de pacientes com DH (LOW *et al.*, 2011). Essa ausência de efeito na proliferação com o marcador PCNA pode ser explicada pelo fato de que o PCNA tem uma meia-vida longa, o que pode levar à coloração positiva de células que entram na fase G0 do ciclo celular, além disso, é possível que a proporção entre o número de células em G0 e o número de células em todas as fases do ciclo celular seja maior em camundongos YAC128 do que nos selvagens (MANDYAM *et al.*, 2007). Assim, mesmo que os YAC128 tenham menos células nas fases ativas do ciclo celular um aumento no número de células na fase G0 pode contrabalançar esta redução, causando a falta de diferença significativa no número de células positivas para PCNA que foram observadas entre os camundongos YAC128 e selvagens (SCOTT *et al.*, 1991; ZACCHETTI *et al.*, 2003; SIMPSON *et al.*, 2011).

Outro protocolo que foi realizado neste trabalho a fim de avaliar uma das fases da neurogênese foi a imuno-histoquímica para DCX, a qual avalia a fase de diferenciação neuronal. Neste caso observou-se que o AE aumentou significativamente a diferenciação neuronal tanto em camundongos selvagens quanto em camundongos YAC128 na formação hipocampal total. Quando as regiões dorsal e ventral foram avaliadas separadamente viu-se que o número de células marcadas positivamente para DCX também aumentou significativamente nas duas regiões, tanto em camundongos selvagens quanto em camundongos YAC128. Esses achados estão de acordo com a literatura que demonstra que o AE aumenta a diferenciação neuronal em diferentes modelos experimentais (MELLEU, 2012; VANPRAAG *et al.*, 1999; UZOKWE, 2017), inclusive em modelos de DH (LAZIC *et al.*, 2006).

A fase de maturação neuronal é controlada em grande parte independentemente da regulação da proliferação de células precursoras e da saída do ciclo celular (PLUMPE *et al.*, 2006), o que explica o fato de que, embora nossos resultados demonstrem um decréscimo de células Ki-67 positivas no AE em camundongos YAC128, o número de células DCX positivas aumentou no mesmo grupo. A proliferação, a sobrevivência e a diferenciação das células progenitoras são individualmente influenciadas por características hereditárias e não são uniformemente reguladas em resposta à estimulação ambiental (KEMPERMANN *et al.*, 1998a). Neste sentido, é possível que o AE tenha exercido influências diferentes sobre as fases da neurogênese. A exposição ao AE aumenta fatores de crescimento entre eles o BDNF (ICKES *et al.*, 2000), porém de

acordo com Ahmed *et al.*, (1995) BDNF aumenta a diferenciação, mas exerce menor efeito sobre a sobrevivência de precursores neuronais (AHMED *et al.*, 1995). Além disso, é possível que as células Ki-67 positivas nos camundongos YAC128 expostos ao AC tenham aumentado por estarem permanecendo mais tempo na fase G2 do ciclo celular. É durante essa fase que ocorre a checagem de danos no DNA (JACKSON *et al.*, 2005; CHANG *et al.*, 2006; LAKSHMANA *et al.*, 2007). Nesta fase o PCNA é menos expresso, provavelmente por isso não houve aumento desse marcador nos camundongos YAC128. No AE a queda do número de células Ki-67 positivas poderia ser resultado de uma aceleração na diferenciação neuronal, assim as células passariam menos tempo na fase de proliferação.

A migração e a diferenciação das células neurais são rigorosamente reguladas por fatores extracelulares e pela expressão gênica intracelular, que são, em parte, regulados por mecanismos epigenéticos (MIZUTANI *et al.*, 2007; NAMIHIRA *et al.*, 2008). Os mecanismos epigenéticos são reguladores chave tanto para a manutenção da pluripotência como para a especificação do destino celular (HIRABAYASHI e GOTOH, 2010) e o ambiente é capaz de induzir mudanças epigenéticas, como por exemplo, alterando a atividade transcricional e modulando a expressão de genes (BARONCELLI *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2018).

O AE é capaz de provocar mudanças no sistema nervoso também através da reorganização do citoesqueleto de neurônios. Em roedores o AE aumenta a arborização dendrítica (LEGGIO *et al.*, 2005; BINDU *et al.*, 2007). Além disso, anormalidades morfológicas em dendritos têm sido observadas em pacientes com Huntington e em modelos animais da DH (SPIRES *et al.*, 2004). Estudos prévios comprovaram que a DCX é um marcador eficaz para analisar arborização dendrítica (RAO e SHETTY, 2004). Neste sentido, analisamos nesse trabalho neurônios imaturos, de camundongos selvagens e YAC128, que foram marcados através de imuno-histoquímica para DCX, para avaliar possíveis alterações nas ramificações destes neurônios.

Foram avaliados alguns parâmetros das ramificações dendríticas através de análise de Sholl (SHOLL, 1953) e observou-se que o AE foi capaz de causar algumas alterações nas ramificações dos neurônios imaturos da ZSG do GD da formação hipocampal. A distância máxima alcançada pelos dendritos foi significativamente maior nos camundongos selvagens expostos ao AE. Esse aumento dos dendritos também foi observado nos camundongos selvagens quando as porções dorsal e ventral da formação hipocampal foram avaliadas separadamente. Nossos resultados estão de acordo com o estudo de Lazic *et al.*, (2006) que

demonstrou que o AE pode aumentar a arborização dendrítica tanto em camundongos selvagens quanto no modelo de DH R6/1. Por outro lado, não foram encontradas diferenças significativas entre a arborização dendrítica de camundongos selvagens e camundongos YAC128. Além disso, a arborização dendrítica nos camundongos YAC128 não sofreu um efeito significativo do AE (LAZIC *et al.*, 2006).

Outro parâmetro analisado foi a somatória das intersecções observadas na análise de Sholl. O número total de intersecções foi significativamente maior nos camundongos selvagens expostos ao AE. Esse aumento causado pelo AE também foi visto de forma significativa nos camundongos selvagens quando analisado as porções dorsal e ventral da formação hipocampal separadamente. Nos camundongos YAC128 esse aumento da somatória de intersecções não foi significativo.

Por último, foi avaliado o número de intersecções por raio na análise de Sholl. Esse aspecto da ramificação dendrítica não sofreu alterações significativas causadas pelo AE tanto em camundongos selvagens quanto nos camundongos YAC128. Estudos prévios que analisaram a arborização dendrítica de camundongos YAC128 com um mês de idade não encontraram diferenças no genótipo (MILNERWOOD *et al.*, 2010) nem aos três meses de idade em neurônios espinhosos médio estriatais (MILNERWOOD *et al.*, 2010; MADISON *et al.*, 2012) e em neurônios imaturos do GD da formação hipocampal (DA FONSECA *et al.*, 2018). Nosso estudo está de acordo com a literatura porque aos quatro meses de idade também não houve diferenças do genótipo na arborização dendrítica em neurônios imaturos hipocampais.

O presente estudo evidencia os efeitos benéficos do AE na neuroplasticidade hipocampal no camundongo YAC128. Sugerindo que terapias preventivas capazes de melhorar a plasticidade neural podem ser de extrema importância no intuito de retardar a progressão da DH.



## 7 CONCLUSÃO

Este estudo confirmou que a exposição a um AE entre os 2 e 4 meses de idade é capaz de afetar a neuroplasticidade em camundongos selvagens e em camundongos YAC128. O AE aumentou a proliferação celular na ZSG do GD da formação hipocampal em camundongos selvagens e aumentou a diferenciação neuronal na ZSG do GD da formação hipocampal em camundongos selvagens e em camundongos YAC128. Além disso, neurônios imaturos da ZSG do GD da formação hipocampal de camundongos selvagens tiveram a sua arborização dendrítica alterada pelo AE, de modo que a distância máxima alcançada pelos dendritos e o número de intersecções dos dendritos com os raios da Análise de Shol foram aumentados. Assim destaca-se um possível papel terapêutico para o AE como tratamento para os prejuízos na neuroplasticidade que ocorrem na DH.



## 8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Considerando os resultados deste trabalho, a necessidade de buscas de tratamento para a DH e a carência de outros estudos com AE em modelos animais de DH, sugere-se continuar a avaliação do AE no modelo animal YAC128. Neste sentido, além de confirmar os dados aqui demonstrados, pesquisas futuras podem analisar:

- Sobrevivência neuronal através de imuno-histoquímica para BrdU (Bromodeoxyuridine) e co-marcação com NeuN e GFAP;
- Expressão de fatores neurotróficos, como BDNF e NGF (fatores de crescimento) através de teste de ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática);
- Complexidade dendrítica e densidade sináptica de neurônios adultos marcados pela técnica de Golgi;
- Neurodegeneração estriatal através de imuno-histoquímica para o marcador estriatal DARPP-32 e da técnica de TUNEL;
- Neurogênese na ZSV através de imuno-histoquímica para Ki-67, DCX e BrdU;
- Variações do protocolo de AE, como por exemplo, aumento do tempo de duração do enriquecimento ou o adiantamento/postergação do início do enriquecimento, ou ainda, alternância de AE com AC;
- Realizar avaliações comportamentais;
- Correlacionar dados morfológicos com as avaliações comportamentais.



## REFERÊNCIAS

- AHMED, S.; REYNOLDS, B. A.; WEISS, S. **BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors.** *Journal of Neuroscience*, v. 15, n. 8, p. 5765-5778, 1995. ISSN 0270-6474.
- ALTMAN, J.; DAS, G. D. **Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats.** *Journal of Comparative Neurology*, v. 124, n. 3, p. 319-335, 1965. ISSN 1096-9861.
- AMARAL, O. B. et al. **Duration of environmental enrichment influences the magnitude and persistence of its behavioral effects on mice.** *Physiol Behav*, v. 93, n. 1-2, p. 388-94, Jan 28 2008. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking).
- ANDREASSEN, O. A. et al. **Dichloroacetate exerts therapeutic effects in transgenic mouse models of Huntington's disease.** *Ann Neurol*, v. 50, n. 1, p. 112-7, Jul 2001. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134 (Linking).
- ARVIDSSON, A. et al. **Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke.** *Nat Med*, v. 8, n. 9, p. 963-70, Sep 2002. ISSN 1078-8956 (Print) 1078-8956 (Linking).
- BANNERMAN, D. et al. **Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety.** *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 28, n. 3, p. 273-283, 2004. ISSN 0149-7634.
- BARONCELLI, L. et al. **Nurturing brain plasticity: impact of environmental enrichment.** *Cell death and differentiation*, v. 17, n. 7, p. 1092, 2010. ISSN 1476-5403.
- BATES, G. P. **History of genetic disease: the molecular genetics of Huntington disease - a history.** *Nat Rev Genet*, v. 6, n. 10, p. 766-73, Oct 2005. ISSN 1471-0056 (Print) 1471-0056 (Linking).
- BAVELIER, D.; NEVILLE, H. J. **Cross-modal plasticity: where and how?** *Nature Reviews Neuroscience*, v. 3, n. 6, p. 443, 2002. ISSN 1471-0048.
- BENAROYA-MILSHTEIN, N. et al. **Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity.** *Eur J Neurosci*, v. 20, n. 5, p. 1341-7, Sep 2004. ISSN 0953-816X (Print) 0953-816X (Linking).

BENNETT, E. L.; ROSENZWEIG, M. R.; DIAMOND, M. C. **Rat brain: effects of environmental enrichment on wet and dry weights.** *Science*, v. 163, n. 3869, p. 825-6, Feb 21 1969. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).

BERARDELLI, A. et al. **Pathophysiology of chorea and bradykinesia in Huntington's disease.** *Mov Disord*, v. 14, n. 3, p. 398-403, May 1999. ISSN 0885-3185 (Print) 0885-3185 (Linking).

BINDU, B. et al. **Short-term exposure to an enriched environment enhances dendritic branching but not brain-derived neurotrophic factor expression in the hippocampus of rats with ventral subicular lesions.** *Neuroscience*, v. 144, n. 2, p. 412-423, 2007. ISSN 0306-4522.

BONELLI, R. M.; HOFMANN, P. **A systematic review of the treatment studies in Huntington's disease since 1990.** *Expert opinion on pharmacotherapy*, v. 8, n. 2, p. 141-153, 2007. ISSN 1465-6566.

BOSERET, G.; BALL, G. F.; BALTHAZART, J. **The microtubule-associated protein doublecortin is broadly expressed in the telencephalon of adult canaries.** *Journal of chemical neuroanatomy*, v. 33, n. 3, p. 140-154, 2007. ISSN 0891-0618.

BOUET, V. et al. **Continuous enriched environment improves learning and memory in adult NMRI mice through theta burst-related-LTP independent mechanisms but is not efficient in advanced aged animals.** *Mech Ageing Dev*, v. 132, n. 5, p. 240-8, May 2011. ISSN 1872-6216 (Electronic) 0047-6374 (Linking).

BRENES, J. C.; PADILLA, M.; FORNAGUERA, J. **A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats.** *Behav Brain Res*, v. 197, n. 1, p. 125-37, Jan 30 2009. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking).

BROWN, J. P. et al. **Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis.** *Journal of Comparative Neurology*, v. 467, n. 1, p. 1-10, 2003. ISSN 1096-9861.

BRUEL-JUNGERMAN, E.; LAROCHE, S.; RAMPON, C. **New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment.** *Eur J Neurosci*, v. 21, n. 2, p. 513-21, Jan 2005. ISSN 0953-816X (Print) 0953-816X (Linking).

BURGESS, H. A.; REINER, O. **Doublecortin-like kinase is associated with microtubules in neuronal growth cones.** *Molecular and Cellular Neuroscience*, v. 16, n. 5, p. 529-541, 2000. ISSN 1044-7431.

CAI, Y. et al. **Doublecortin expression in adult cat and primate cerebral cortex relates to immature neurons that develop into GABAergic subgroups.** *Experimental neurology*, v. 216, n. 2, p. 342-356, 2009. ISSN 0014-4886.

CAMERON, H.; GOULD, E. **Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus.** *Neuroscience*, v. 61, n. 2, p. 203-209, 1994. ISSN 0306-4522.

CASTRO, C. D. P. N.; GIL-MOHAPEL, J.; BROCARD, P. S. **Exercício físico e neuroplasticidade hipocampal: Revisão de literatura.** *VITTALLE-Revista de Ciências da Saúde*, v. 29, n. 2, p. 57-78, 2017. ISSN 2177-7853.

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. ISSN 0962-8924.

CHANG, P. A. et al. **Effect of over-expression of neuropathy target esterase on mammalian cell proliferation.** *Cell proliferation*, v. 39, n. 5, p. 429-440, 2006. ISSN 1365-2184.

CHRISTIE, B. R.; CAMERON, H. A. **Neurogenesis in the adult hippocampus.** *Hippocampus*, v. 16, n. 3, p. 199-207, 2006. ISSN 1098-1063.

CIAMEI, A.; MORTON, A. J. **Rigidity in social and emotional memory in the R6/2 mouse model of Huntington's disease.** *Neurobiol Learn Mem*, v. 89, n. 4, p. 533-44, May 2008. ISSN 1095-9564 (Electronic) 1074-7427 (Linking).

COLLINGRIDGE, G. L. et al. **Long-term depression in the CNS.** *Nature reviews neuroscience*, v. 11, n. 7, p. 459, 2010. ISSN 1471-0048.

COUILLARD-DESPRES, S. et al. **Molecular mechanisms of neuronal migration disorders, quo vadis?** *Current molecular medicine*, v. 1, n. 6, p. 677-688, 2001. ISSN 1566-5240.

COUILLARD- DESPRES, S. et al. **Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis.** European Journal of Neuroscience, v. 21, n. 1, p. 1-14, 2005. ISSN 1460-9568.

CROOK, Z. R.; HOUSMAN, D. **Huntington's disease: can mice lead the way to treatment?** Neuron, v. 69, n. 3, p. 423-435, 2011. ISSN 0896-6273.

CROSSMAN, A. et al. **Chorea and myoclonus in the monkey induced by gamma-aminobutyric acid antagonism in the lentiform complex: the site of drug action and a hypothesis for the neural mechanisms of chorea.** Brain, v. 111, n. 5, p. 1211-1233, 1988. ISSN 1460-2156.

CROSSMAN, A. R. **Primate models of dyskinesia: the experimental approach to the study of basal ganglia-related involuntary movement disorders.** Neuroscience, v. 21, n. 1, p. 1-40, 1987. ISSN 0306-4522.

CURTIS, M. et al. **The distribution of progenitor cells in the subependymal layer of the lateral ventricle in the normal and Huntington's disease human brain.** Neuroscience, v. 132, n. 3, p. 777-788, 2005. ISSN 0306-4522.

CURTIS, M. A. et al. **Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 100, n. 15, p. 9023-9027, 2003. ISSN 0027-8424.

DA FONSECA, V. S. et al. **Brain-Derived Neurotrophic Factor Prevents Depressive-Like Behaviors in Early-Symptomatic YAC128 Huntington's Disease Mice.** Mol Neurobiol, Jan 31 2018. ISSN 1559-1182 (Electronic) 0893-7648 (Linking).

DE TOMMASO, M. et al. **Effects of rivastigmine on motor and cognitive impairment in Huntington's disease.** Movement disorders, v. 19, n. 12, p. 1516-1518, 2004. ISSN 1531-8257.

DEGROOT, A.; TREIT, D. **Anxiety is functionally segregated within the septo-hippocampal system.** Brain research, v. 1001, n. 1-2, p. 60-71, 2004. ISSN 0006-8993.

DIAMOND, M. C.; KRECH, D.; ROSENZWEIG, M. R. **The Effects of an Enriched Environment on the Histology of the Rat Cerebral Cortex.** J Comp Neurol, v. 123, p. 111-20, Aug 1964. ISSN 0021-9967 (Print) 0021-9967 (Linking).



DIFIGLIA, M. et al. **Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain.** Science, v. 277, n. 5334, p. 1990-1993, 1997. ISSN 0036-8075.

DRANOVSKY, A.; HEN, R. **Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants.** Biological psychiatry, v. 59, n. 12, p. 1136-1143, 2006. ISSN 0006-3223.

DRAPEAU, E.; NORA ABROUS, D. **Stem Cell Review Series: Role of neurogenesis in age- related memory disorders.** Aging cell, v. 7, n. 4, p. 569-589, 2008. ISSN 1474-9726.

DUAN, W. et al. **Sertraline slows disease progression and increases neurogenesis in N171-82Q mouse model of Huntington's disease.** Neurobiol Dis, v. 30, n. 3, p. 312-22, Jun 2008. ISSN 1095-953X (Electronic) 0969-9961 (Linking).

DUAN, X. et al. **Development of neural stem cell in the adult brain.** Current opinion in neurobiology, v. 18, n. 1, p. 108-115, 2008. ISSN 0959-4388.

EDDY, C. M. et al. **M8 Transcranial direct current stimulation and cognitive training for working memory in huntington's disease:** BMJ Publishing Group Ltd 2016.

EHRNHOFER, D. E. et al. **Mouse models of Huntington disease: variations on a theme.** Dis Model Mech, v. 2, n. 3-4, p. 123-9, Mar-Apr 2009. ISSN 1754-8411 (Electronic) 1754-8403 (Linking).

ERIKSSON, P. S. et al. **Neurogenesis in the adult human hippocampus.** Nature medicine, v. 4, n. 11, p. 1313, 1998. ISSN 1546-170X.

FANSELOW, M. S.; DONG, H.-W. **Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?** Neuron, v. 65, n. 1, p. 7-19, 2010. ISSN 0896-6273.

FARRER, L. A. **Suicide and attempted suicide in Huntington disease: implications for preclinical testing of persons at risk.** Am J Med Genet, v. 24, n. 2, p. 305-11, Jun 1986. ISSN 0148-7299 (Print) 0148-7299 (Linking).

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. ISSN 0306-4522.

FOLSTEIN, S. E. et al. **The association of affective disorder with Huntington's disease in a case series and in families.** *Psychological medicine*, v. 13, n. 3, p. 537-542, 1983. ISSN 1469-8978.

FRERET, T. et al. **Rescue of cognitive aging by long-lasting environmental enrichment exposure initiated before median lifespan.** *Neurobiol Aging*, v. 33, n. 5, p. 1005 e1-10, May 2012. ISSN 1558-1497 (Electronic) 0197-4580 (Linking).

FUCHS, E.; FLÜGGE, G. **Adult neuroplasticity: more than 40 years of research.** *Neural plasticity*, v. 2014, 2014. ISSN 2090-5904.

GAGE, F. H. **Structural plasticity of the adult brain.** *Dialogues in clinical neuroscience*, v. 6, n. 2, p. 135, 2004.

GALAND, P.; DEGRAEF, C. **Cyclin/PCNA immunostaining as an alternative to tritiated thymidine pulse labelling for marking S phase cells in paraffin sections from animal and human tissues.** *Cell Proliferation*, v. 22, n. 5, p. 383-392, 1989. ISSN 1365-2184.

GALANI, R. et al. **The behavioral effects of enriched housing are not altered by serotonin depletion but enrichment alters hippocampal neurochemistry.** *Neurobiol Learn Mem*, v. 88, n. 1, p. 1-10, Jul 2007. ISSN 1074-7427 (Print) 1074-7427 (Linking).

GARCIA-GORRO, C.; CAMARA, E.; DE DIEGO-BALAGUER, R. **Neuroimaging as a tool to study the sources of phenotypic heterogeneity in Huntington's disease.** *Curr Opin Neurol*, v. 30, n. 4, p. 398-404, Aug 2017. ISSN 1473-6551 (Electronic) 1350-7540 (Linking).

GARCÍA-VERDUGO, J. M. et al. **The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals.** *Brain research bulletin*, v. 57, n. 6, p. 765-775, 2002. ISSN 0361-9230.

GE, S. et al. **Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus.** *The Journal of physiology*, v. 586, n. 16, p. 3759-3765, 2008. ISSN 1469-7793.

GELFO, F. et al. **Enriched environment improves motor function and increases neurotrophins in hemicerebellar lesioned rats.** *Neurorehabil Neural Repair*, v. 25, n. 3, p. 243-52, Mar-Apr 2011. ISSN 1552-6844 (Electronic) 1545-9683 (Linking).

GIL-MOHAPEL, J. **Transgenic models of Huntington's disease: Differences, similarities, and applications.** Recent Devel Brain Res. Kerala, India, Research Signpost, v. 1, p. 45-76, 2012.

GIL-MOHAPEL, J. et al. **Neurogenesis in Huntington's disease: can studying adult neurogenesis lead to the development of new therapeutic strategies?** Brain Res, v. 1406, p. 84-105, Aug 11 2011. ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking).

GIL-MOHAPEL, J. M.; REGO, A. C. **Doença de Huntington: uma revisão dos aspectos fisiopatológicos.** Rev Neurocienc, v. 19, n. 4, p. 724-34, 2011.

GIL, J. M. et al. **Asialoerythropoietin is not effective in the R6/2 line of Huntington's disease mice.** BMC Neurosci, v. 5, p. 17, May 10 2004. ISSN 1471-2202 (Electronic) 1471-2202 (Linking).

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. ISSN 0969-9961.

GIL, J. M.; REGO, A. C. **Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease.** Eur J Neurosci, v. 27, n. 11, p. 2803-20, Jun 2008. ISSN 1460-9568 (Electronic) 0953-816X (Linking).

GIRALT, A. et al. **Brain-derived neurotrophic factor modulates the severity of cognitive alterations induced by mutant huntingtin: involvement of phospholipase C $\gamma$  activity and glutamate receptor expression.** Neuroscience, v. 158, n. 4, p. 1234-50, Feb 18 2009. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking).

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, 1998. ISSN 0092-8674.

GONÇALVES, J. T.; SCHAFFER, S. T.; GAGE, F. H. **Adult neurogenesis in the hippocampus: from stem cells to behavior.** Cell, v. 167, n. 4, p. 897-914, 2016. ISSN 0092-8674.

GOULD, E. et al. **Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 95, n. 6, p. 3168-3171, 1998. ISSN 0027-8424.

GRAYBIEL, A. M. **Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia.** Trends in neurosciences, v. 13, n. 7, p. 244-254, 1990. ISSN 0166-2236.

GROTE, H. E. et al. **Cognitive disorders and neurogenesis deficits in Huntington's disease mice are rescued by fluoxetine.** Eur J Neurosci, v. 22, n. 8, p. 2081-8, Oct 2005. ISSN 0953-816X (Print) 0953-816X (Linking).

GROTE, H. E.; HANNAN, A. J. **Regulators of adult neurogenesis in the healthy and diseased brain.** Clin Exp Pharmacol Physiol, v. 34, n. 5-6, p. 533-45, May-Jun 2007. ISSN 0305-1870 (Print) 0305-1870 (Linking).

GROUP, H. S. D. C. R. **A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group.** *Cell*. 72: 971-83 p. 1993.

GUSELLA, J. F. et al. **A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease.** Nature, v. 306, n. 5940, p. 234, 1983. ISSN 1476-4687.

HAN, I. et al. **Differential vulnerability of neurons in Huntington's disease: the role of cell type- specific features.** Journal of neurochemistry, v. 113, n. 5, p. 1073-1091, 2010. ISSN 1471-4159.

HATTORI, S. et al. **Enriched environments influence depression-related behavior in adult mice and the survival of newborn cells in their hippocampi.** Behav Brain Res, v. 180, n. 1, p. 69-76, Jun 4 2007. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking).

HEATHFIELD, K. **Huntington's chorea: a centenary review.** Postgraduate medical journal, v. 49, n. 567, p. 32, 1973.

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. ISSN 0304-3940.

HEINSEN, H. et al. **Cortical and striatal neurone number in Huntington's disease.** Acta neuropathologica, v. 88, n. 4, p. 320-333, 1994. ISSN 0001-6322.

HICKEY, M.; CHESSELET, M.-F. **The use of transgenic and knock-in mice to study Huntington's disease.** Cytogenetic and genome research, v. 100, n. 1-4, p. 276-286, 2003. ISSN 1424-8581.

HIRABAYASHI, Y.; GOTOH, Y. **Epigenetic control of neural precursor cell fate during development.** Nature Reviews Neuroscience, v. 11, n. 6, p. 377, 2010. ISSN 1471-0048.

HOFFNER, G.; KAHLEM, P.; DJIAN, P. **Perinuclear localization of huntingtin as a consequence of its binding to microtubules through an interaction with  $\beta$ -tubulin: relevance to Huntington's disease.** Journal of cell science, v. 115, n. 5, p. 941-948, 2002. ISSN 0021-9533.

HOFSTETTER, J. R. et al. **Genomic DNA from mice: a comparison of recovery methods and tissue sources.** Biochem Mol Med, v. 62, n. 2, p. 197-202, Dec 1997. ISSN 1077-3150 (Print) 1077-3150 (Linking).

HUANG, F. L.; HUANG, K. P.; BOUCHERON, C. **Long-term enrichment enhances the cognitive behavior of the aging neurogranin null mice without affecting their hippocampal LTP.** Learn Mem, v. 14, n. 8, p. 512-9, Aug 2007. ISSN 1549-5485 (Electronic) 1072-0502 (Linking).

ICKES, B. R. et al. **Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain.** Exp Neurol, v. 164, n. 1, p. 45-52, Jul 2000. ISSN 0014-4886 (Print) 0014-4886 (Linking).

INO, H.; CHIBA, T. **Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the adult and developing mouse nervous system.** Molecular brain research, v. 78, n. 1-2, p. 163-174, 2000. ISSN 0169-328X.

JACKSON, M. W. et al. **p130/p107/p105Rb-dependent transcriptional repression during DNA-damage-induced cell-cycle exit at G2.** Journal of cell science, v. 118, n. 9, p. 1821-1832, 2005. ISSN 0021-9533.

JANUÁRIO, C. **Doença de Huntington: onde estamos agora?** 2011.

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. ISSN 0014-4886.

JHA, S.; DONG, B.; SAKATA, K. **Enriched environment treatment reverses depression-like behavior and restores reduced hippocampal neurogenesis and protein levels of brain-derived neurotrophic factor in mice lacking its expression through promoter IV.** Transl Psychiatry, v. 1, p. e40, Sep 13 2011. ISSN 2158-3188 (Electronic) 2158-3188 (Linking).

JIN, K. et al. **Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease.** Proc Natl Acad Sci U S A, v. 101, n. 1, p. 343-7, Jan 6 2004. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).

JIN, K. et al. **Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain.** Proc Natl Acad Sci U S A, v. 103, n. 35, p. 13198-202, Aug 29 2006. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).

JIN, X. **The role of neurogenesis during development and in the adult brain.** European Journal of Neuroscience, v. 44, n. 6, p. 2291-2299, 2016. ISSN 1460-9568.

KALTENBACH, L. S. et al. **Huntingtin interacting proteins are genetic modifiers of neurodegeneration.** PLoS genetics, v. 3, n. 5, p. e82, 2007. ISSN 1553-7404.

KANG, W.; HÉBERT, J. M. **FGF signaling is necessary for neurogenesis in young mice and sufficient to reverse its decline in old mice.** Journal of Neuroscience, v. 35, n. 28, p. 10217-10223, 2015. ISSN 0270-6474.

KEE, N. et al. **The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis.** Journal of neuroscience methods, v. 115, n. 1, p. 97-105, 2002. ISSN 0165-0270.

KEMPERMANN, G.; BRANDON, E. P.; GAGE, F. H. **Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus.** Curr Biol, v. 8, n. 16, p. 939-42, Jul 30-Aug 13 1998a. ISSN 0960-9822 (Print) 0960-9822 (Linking).

KEMPERMANN, G.; GAST, D.; GAGE, F. H. **Neuroplasticity in old age: Sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment.** Annals of neurology, v. 52, n. 2, p. 135-143, 2002. ISSN 1531-8249.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F. H. **More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment.** Nature, v. 386, n. 6624, p. 493-5, Apr 3 1997. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).

KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F. H. **Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus.** Journal of Neuroscience, v. 18, n. 9, p. 3206-3212, 1998b. ISSN 0270-6474.

KEMPERMANN, G.; SONG, H.; GAGE, F. H. **Neurogenesis in the Adult Hippocampus**. Cold Spring Harb Perspect Biol, v. 7, n. 9, p. a018812, Sep 1 2015. ISSN 1943-0264 (Electronic) 1943-0264 (Linking).

KUEMMERLE, S. et al. **Huntingtin aggregates may not predict neuronal death in Huntington's disease**. Annals of neurology, v. 46, n. 6, p. 842-849, 1999. ISSN 1531-8249.

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**. Hum Mol Genet, v. 16, n. 15, p. 1845-61, Aug 1 2007. ISSN 0964-6906 (Print) 0964-6906 (Linking).

KUHN, H. G.; DICKINSON-ANSON, H.; GAGE, F. H. **Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation**. J Neurosci, v. 16, n. 6, p. 2027-33, Mar 15 1996. ISSN 0270-6474 (Print) 0270-6474 (Linking).

KURKI, P. et al. **Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle**. Experimental cell research, v. 166, n. 1, p. 209-219, 1986. ISSN 0014-4827.

LAKSHMANA, M. K.; HARA, H.; TABIRA, T. **Amyloid beta protein-related death- inducing protein induces G2/M arrest: Implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease**. Journal of neuroscience research, v. 85, n. 10, p. 2262-2271, 2007. ISSN 1097-4547.

LANDLES, C.; BATES, G. P. **Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease: Fourth in Molecular Medicine Review Series**. EMBO reports, v. 5, n. 10, p. 958-963, 2004. ISSN 1469-221X.

LANGBEHN, D. R. et al. **A new model for prediction of the age of onset and penetrance for Huntington's disease based on CAG length**. Clinical genetics, v. 65, n. 4, p. 267-277, 2004. ISSN 1399-0004.

LAST, J. M.; ABRAMSON, J. H.; FREIDMAN, G. D. **A dictionary of epidemiology**. Oxford University Press New York, 2001.

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. ISSN 1354-3776.

LAZIC, S. E. et al. **Decreased hippocampal cell proliferation in R6/1 Huntington's mice.** *Neuroreport*, v. 15, n. 5, p. 811-3, Apr 9 2004. ISSN 0959-4965 (Print) 0959-4965 (Linking).

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. ISSN 1460-9568.

LEGGIO, M. G. et al. **Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat.** *Behavioural brain research*, v. 163, n. 1, p. 78-90, 2005. ISSN 0166-4328.

LEUNER, B.; GOULD, E. **Structural plasticity and hippocampal function.** *Annual review of psychology*, v. 61, p. 111-140, 2010. ISSN 0066-4308.

LI, Y. et al. **Cholinesterase inhibitors for rarer dementias associated with neurological conditions.** *The Cochrane Library*, 2015. ISSN 1465-1858.

LIONE, L. A. et al. **Selective discrimination learning impairments in mice expressing the human Huntington's disease mutation.** *J Neurosci*, v. 19, n. 23, p. 10428-37, Dec 1 1999. ISSN 0270-6474 (Print) 0270-6474 (Linking).

LLEDO, P.-M.; ALONSO, M.; GRUBB, M. S. **Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits.** *Nature Reviews Neuroscience*, v. 7, n. 3, p. 179, 2006. ISSN 1471-0048.

LLORENS-MARTIN, M. V. et al. **Both increases in immature dentate neuron number and decreases of immobility time in the forced swim test occurred in parallel after environmental enrichment of mice.** *Neuroscience*, v. 147, n. 3, p. 631-8, Jul 13 2007. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking).

LOW, V. et al. **No change in progenitor cell proliferation in the hippocampus in Huntington's disease.** *Neuroscience*, v. 199, p. 577-588, 2011. ISSN 0306-4522.

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. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking).



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. ISSN 0270-6474.

MANDYAM, C. D.; HARBURG, G. C.; EISCH, A. J. **Determination of key aspects of precursor cell proliferation, cell cycle length and kinetics in the adult mouse subgranular zone.** *Neuroscience*, v. 146, n. 1, p. 108-122, 2007. ISSN 0306-4522.

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. ISSN 0092-8674.

MANN, D.; OLIVER, R.; SNOWDEN, J. **The topographic distribution of brain atrophy in Huntington's disease and progressive supranuclear palsy.** *Acta neuropathologica*, v. 85, n. 5, p. 553-559, 1993. ISSN 0001-6322.

MARTINOWICH, K.; MANJI, H.; LU, B. **New insights into BDNF function in depression and anxiety.** *Nat Neurosci*, v. 10, n. 9, p. 1089-93, Sep 2007. ISSN 1097-6256 (Print) 1097-6256 (Linking).

MCCOLGAN, P.; TABRIZI, S. J. **Huntington's disease: a clinical review.** *European journal of neurology*, 2017. ISSN 1468-1331.

MILLER, B. R.; HEN, R. **The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety.** *Current opinion in neurobiology*, v. 30, p. 51-58, 2015. ISSN 0959-4388.

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. 178-90, Jan 28 2010. ISSN 1097-4199 (Electronic) 0896-6273 (Linking).

MING, G. L.; SONG, H. **Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions.** *Neuron*, v. 70, n. 4, p. 687-702, May 26 2011. ISSN 1097-4199 (Electronic) 0896-6273 (Linking).

MITCHELL, I.; COOPER, A.; GRIFFITHS, M. **The selective vulnerability of striatopallidal neurons.** *Progress in neurobiology*, v. 59, n. 6, p. 691-719, 1999. ISSN 0301-0082.

MIZUTANI, K.-I. et al. **Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors.** *Nature*, v. 449, n. 7160, p. 351, 2007. ISSN 1476-4687.

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.** *J Neurosci*, v. 20, n. 13, p. 5115-23, Jul 1 2000. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking).

NAMIHIRA, M. et al. **Epigenetic mechanisms regulating fate specification of neural stem cells.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 363, n. 1500, p. 2099-2109, 2008. ISSN 0962-8436.

NITHIANANTHARAJAH, J. et al. **Gene-environment interactions modulating cognitive function and molecular correlates of synaptic plasticity in Huntington's disease transgenic mice.** *Neurobiol Dis*, v. 29, n. 3, p. 490-504, Mar 2008. ISSN 1095-953X (Electronic) 0969-9961 (Linking).

NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A. J. **Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system.** *Nat Rev Neurosci*, v. 7, n. 9, p. 697-709, Sep 2006. ISSN 1471-003X (Print) 1471-003X (Linking).

ORTH, M. et al. **Observing Huntington's disease: the European Huntington's Disease Network's REGISTRY.** *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 82, n. 12, p. 1409-12, Dec 2011. ISSN 1468-330X (Electronic) 0022-3050 (Linking).

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, 2008. ISSN 1460-2083.

PANG, T. Y. 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. 569-84, Aug 25 2006. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking).

PAULSEN, J. et al. **Detection of Huntington's disease decades before diagnosis: the Predict-HD study.** *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, v. 79, n. 8, p. 874-880, 2008. ISSN 0022-3050.

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.** *Exp Neurol*, v. 210, n. 1, p. 154-63, Mar 2008. ISSN 0014-4886 (Print) 0014-4886 (Linking).

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. ISSN 0270-6474.

PHILLIPS, W.; SHANNON, K. M.; BARKER, R. A. **The current clinical management of Huntington's disease.** *Mov Disord*, v. 23, n. 11, p. 1491-504, Aug 15 2008. ISSN 1531-8257 (Electronic) 0885-3185 (Linking).

PITTENGER, C.; DUMAN, R. S. **Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms.** *Neuropsychopharmacology*, v. 33, n. 1, p. 88, 2008. ISSN 1740-634X.

PLUMPE, T. et al. **Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation.** *BMC Neurosci*, v. 7, p. 77, Nov 15 2006. ISSN 1471-2202 (Electronic) 1471-2202 (Linking).

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. Pt 4, p. 919-32, Apr 2009. ISSN 1460-2156 (Electronic) 0006-8950 (Linking).

RAMPON, C. et al. **Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice.** *Nat Neurosci*, v. 3, n. 3, p. 238-44, Mar 2000. ISSN 1097-6256 (Print) 1097-6256 (Linking).

RAO, M. S.; SHETTY, A. K. **Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus.** *European Journal of Neuroscience*, v. 19, n. 2, p. 234-246, 2004. ISSN 1460-9568.

REINER, A. et al. **Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 85, n. 15, p. 5733-5737, 1988. ISSN 0027-8424.

RODDA, R. **Cerebellar atrophy in Huntington's disease.** Journal of the neurological sciences, v. 50, n. 1, p. 147-157, 1981. ISSN 0022-510X.

RODRIGUES, F. B. et al. **Tetrabenazine versus deutetrabenazine for Huntington's disease: twins or distant cousins?** Movement disorders clinical practice, v. 4, n. 4, p. 582-585, 2017. ISSN 2330-1619.

ROOS, R. A. **Huntington's disease: a clinical review.** Orphanet journal of rare diseases, v. 5, n. 1, p. 40, 2010. ISSN 1750-1172.

ROOS, R. A. **Huntington's disease: a clinical review.** Orphanet J Rare Dis, v. 5, p. 40, Dec 20 2010. ISSN 1750-1172 (Electronic) 1750-1172 (Linking).

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. ISSN 0028-3878.

ROSAS, H. D. et al. **Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-based morphometric analysis.** Neurology, v. 60, n. 10, p. 1615-20, May 27 2003. ISSN 1526-632X (Electronic) 0028-3878 (Linking).

ROSENZWEIG, M. R. **Environmental complexity, cerebral change, and behavior.** Am Psychol, v. 21, n. 4, p. 321-32, Apr 1966. ISSN 0003-066X (Print) 0003-066X (Linking).

ROSS, C. A.; TABRIZI, S. J. **Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment.** Lancet Neurol, v. 10, n. 1, p. 83-98, Jan 2011. ISSN 1474-4465 (Electronic) 1474-4422 (Linking).

ROT, U. et al. **Rivastigmine in the treatment of Huntington's disease.** European journal of neurology, v. 9, n. 6, p. 689-690, 2002. ISSN 1468-1331.

SANTARELLI, L. et al. **Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants.** science, v. 301, n. 5634, p. 805-809, 2003. ISSN 0036-8075.

SAUDOU, F.; HUMBERT, S. **The Biology of Huntingtin.** Neuron, v. 89, n. 5, p. 910-26, Mar 2 2016. ISSN 1097-4199 (Electronic) 0896-6273 (Linking).

SCHAEFERS, A. T. **Environmental enrichment and working memory tasks decrease hippocampal cell proliferation after wheel running--A**

**role for the prefrontal cortex in hippocampal plasticity?** Brain Res, v. 1624, p. 125-33, Oct 22 2015. ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking).

SCHALLER, W. F. **HUNTINGTON'S CHOREA—SOME PATHOLOGICAL STUDIES: WITH CASE REPORTS.** California and western medicine, v. 28, n. 2, p. 195, 1928.

SCHÖLS, L. et al. **Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis.** The Lancet Neurology, v. 3, n. 5, p. 291-304, 2004. ISSN 1474-4422.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. **The Ki- 67 protein: from the known and the unknown.** Journal of cellular physiology, v. 182, n. 3, p. 311-322, 2000. ISSN 1097-4652.

SCOTT, R. et al. **A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction.** The Journal of pathology, v. 165, n. 2, p. 173-178, 1991. ISSN 1096-9896.

SEMAKA, A. et al. **Predictive testing for Huntington disease: interpretation and significance of intermediate alleles.** Clinical genetics, v. 70, n. 4, p. 283-294, 2006. ISSN 1399-0004.

SHOLL, D. A. **Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat.** J Anat, v. 87, n. 4, p. 387-406, Oct 1953. ISSN 0021-8782 (Print) 0021-8782 (Linking).

SIMPSON, J. M. et al. **Altered adult hippocampal neurogenesis in the YAC128 transgenic mouse model of Huntington disease.** Neurobiol Dis, v. 41, n. 2, p. 249-60, Feb 2011. ISSN 1095-953X (Electronic) 0969-9961 (Linking).

SINGHAL, G. et al. **Cellular and molecular mechanisms of immunomodulation in the brain through environmental enrichment.** Front Cell Neurosci, v. 8, p. 97, 2014. ISSN 1662-5102 (Print) 1662-5102 (Linking).

SLOW, E. J. et al. **Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease.** Hum Mol Genet, v. 12, n. 13, p. 1555-67, Jul 1 2003. ISSN 0964-6906 (Print) 0964-6906 (Linking).

SPARGO, E.; EVERALL, I. P.; LANTOS, P. L. **Neuronal loss in the hippocampus in Huntington's disease: a comparison with HIV infection.** *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 56, n. 5, p. 487-91, May 1993. ISSN 0022-3050 (Print) 0022-3050 (Linking).

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. ISSN 1460-9568.

SPOLIDORO, M. et al. **Plasticity in the adult brain: lessons from the visual system.** *Experimental brain research*, v. 192, n. 3, p. 335-341, 2009. ISSN 0014-4819.

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. ISSN 1939-1471.

STEVENTON, J. J. et al. **In vivo MRI evidence that neuropathology is attenuated by cognitive enrichment in the Yac128 Huntington's disease mouse model.** *Journal of Huntington's disease*, v. 4, n. 2, p. 149-160, 2015. ISSN 1879-6397.

STOREY, E.; BEAL, M. **Neurochemical substrates of rigidity and chorea in Huntington's disease.** *Brain*, v. 116, n. 5, p. 1201-1222, 1993. ISSN 1460-2156.

TAKAHASHI, T.; KATADA, S.; ONODERA, O. **Polyglutamine diseases: where does toxicity come from? what is toxicity? where are we going?** *Journal of molecular cell biology*, v. 2, n. 4, p. 180-191, 2010. ISSN 1759-4685.

TANAPAT, P.; GALEA, L. A.; GOULD, E. **Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus.** *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 16, n. 3-4, p. 235-239, 1998. ISSN 0736-5748.

TANG, Y. P. et al. **Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice.** *Neuropharmacology*, v. 41, n. 6, p. 779-90, Nov 2001. ISSN 0028-3908 (Print) 0028-3908 (Linking).

TATTERSFIELD, A. et al. **Neurogenesis in the striatum of the quinolinic acid lesion model of Huntington's disease.** *Neuroscience*, v. 127, n. 2, p. 319-332, 2004. ISSN 0306-4522.

THARMARATNAM, T. et al. **Exercise becomes brain: sustained aerobic exercise enhances hippocampal neurogenesis.** *The Journal of physiology*, v. 595, n. 1, p. 7-8, 2017. ISSN 1469-7793.

UND HALBACH, O. V. B. **Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus.** *Cell and tissue research*, v. 329, n. 3, p. 409-420, 2007. ISSN 0302-766X.

VAN DELLEN, A. et al. **Delaying the onset of Huntington's in mice.** *Nature*, v. 404, n. 6779, p. 721, 2000. ISSN 1476-4687.

VAN DUIJN, E. et al. **Neuropsychiatric symptoms in a European Huntington's disease cohort (REGISTRY).** *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 85, n. 12, p. 1411-8, Dec 2014. ISSN 1468-330X (Electronic) 0022-3050 (Linking).

VAN LOO, P. L.; VAN ZUTPHEN, L. F.; BAUMANS, V. **Male management: Coping with aggression problems in male laboratory mice.** *Lab Anim*, v. 37, n. 4, p. 300-13, Oct 2003. ISSN 0023-6772 (Print) 0023-6772 (Linking).

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. **Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus.** *Nature neuroscience*, v. 2, n. 3, p. 266, 1999. ISSN 1546-1726.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. **Neural consequences of environmental enrichment.** *Nat Rev Neurosci*, v. 1, n. 3, p. 191-8, Dec 2000. ISSN 1471-003X (Print) 1471-003X (Linking).

VAN RAAMSDONK, J. M. et al. **Cognitive dysfunction precedes neuropathology and motor abnormalities in the YAC128 mouse model of Huntington's disease.** *J Neurosci*, v. 25, n. 16, p. 4169-80, Apr 20 2005. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking).

VAN RAAMSDONK, J. M.; WARBY, S. C.; HAYDEN, M. R. **Selective degeneration in YAC mouse models of Huntington disease.** *Brain Res Bull*, v. 72, n. 2-3, p. 124-31, Apr 30 2007. ISSN 0361-9230 (Print) 0361-9230 (Linking).

VIOLA, G. G. et al. **Influence of environmental enrichment on an object recognition task in CF1 mice.** *Physiol Behav*, v. 99, n. 1, p. 17-21, Jan 12 2010. ISSN 1873-507X (Electronic) 0031-9384 (Linking).

VONSATTEL, J.-P. et al. **Neuropathological classification of Huntington's disease.** *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, v. 44, n. 6, p. 559-577, 1985. ISSN 0022-3069.

VONSATTEL, J. P.; DIFIGLIA, M. **Huntington disease.** *J Neuropathol Exp Neurol*, v. 57, n. 5, p. 369-84, May 1998. ISSN 0022-3069 (Print) 0022-3069 (Linking).

WANG, H. et al. **Tetrabenazine is neuroprotective in Huntington's disease mice.** *Molecular neurodegeneration*, v. 5, n. 1, p. 18, 2010. ISSN 1750-1326.

WANG, L. et al. **Autocrine action of BDNF on dendrite development of adult-born hippocampal neurons.** *Journal of Neuroscience*, v. 35, n. 22, p. 8384-8393, 2015. ISSN 0270-6474.

WATERS, C. **Description of chorea.** *Practice of medicine*. Philadelphia: Lea & Blanchard, 1842.

WEXLER, N. S. et al. **Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, n. 10, p. 3498-503, Mar 9 2004. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).

WYANT, K. J.; RIDDER, A. J.; DAYALU, P. **Huntington's Disease—Update on Treatments.** *Current neurology and neuroscience reports*, v. 17, n. 4, p. 33, 2017. ISSN 1528-4042.

XU, Z. et al. **Antidepressive behaviors induced by enriched environment might be modulated by glucocorticoid levels.** *Eur Neuropsychopharmacol*, v. 19, n. 12, p. 868-75, Dec 2009. ISSN 1873-7862 (Electronic) 0924-977X (Linking).

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

ZACCHETTI, A. et al. **Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non- neoplastic tissues: Comparison of KI- 67**



**and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus in vivo bromodeoxyuridine labelling by immunohistochemistry.** *Apmsis*, v. 111, n. 3, p. 430-438, 2003. ISSN 1600-0463.

ZEITLIN, S. et al. **Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue.** *Nature genetics*, v. 11, n. 2, p. 155, 1995. ISSN 1546-1718.

ZHANG, T. Y. et al. **Environmental enrichment increases transcriptional and epigenetic differentiation between mouse dorsal and ventral dentate gyrus.** *Nat Commun*, v. 9, n. 1, p. 298, Jan 19 2018. ISSN 2041-1723 (Electronic) 2041-1723 (Linking).

ZHAO, C.; DENG, W.; GAGE, F. H. **Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis.** *Cell*, v. 132, n. 4, p. 645-660, 2008. ISSN 0092-8674.

ZUCCATO, C.; CATTANEO, E. **Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease.** *Prog Neurobiol*, v. 81, n. 5-6, p. 294-330, Apr 2007. ISSN 0301-0082 (Print) 0301-0082 (Linking).

ZUCCATO, C. et al. **Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease.** *Science*, v. 293, n. 5529, p. 493-8, Jul 20 2001. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).

ZUCCATO, C. et al. **Progressive loss of BDNF in a mouse model of Huntington's disease and rescue by BDNF delivery.** *Pharmacol Res*, v. 52, n. 2, p. 133-9, Aug 2005. ISSN 1043-6618 (Print) 1043-6618 (Linking).

ZUCCATO, C. et al. **Systematic assessment of BDNF and its receptor levels in human cortices affected by Huntington's disease.** *Brain Pathol*, v. 18, n. 2, p. 225-38, Apr 2008. ISSN 1015-6305 (Print) 1015-6305 (Linking).

ZUCCATO, C.; VALENZA, M.; CATTANEO, E. **Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease.** *Physiol Rev*, v. 90, n. 3, p. 905-81, Jul 2010. ISSN 1522-1210 (Electronic) 0031-9333 (Linking).