



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CAMPUS FLORIANÓPOLIS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Aléxia Micaella da Silva Ferreira

**Caracterização dos efeitos comportamentais e microgliais da administração de
LPS no camundongo YAC128 da doença de Huntington**

Florianópolis/SC

2022

Aléxia Micaella da Silva Ferreira

Dissertação submetida ao Programa de Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Prof. Dr. Patricia de Souza Brocardo

Coorientadora: Prof. Dr. Manuella Kaster

Florianópolis/SC

2022

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

Ferreira, Aléxia

Caracterização dos efeitos comportamentais e microgliais da administração de LPS no camundongo YAC128 da doença de Huntington / Aléxia Ferreira ; orientador, Patricia Brocardo, coorientador, Manuella Kaster, 2022.

78 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Neurociência. 3. Neuroinflamação. 4. Doença neurodegenerativa. 5. Doença de Huntington. I. Brocardo, Patricia. II. Kaster, Manuella. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Neurociências. IV. Título.

Aléxia Micaella da Silva Ferreira

**Caracterização dos efeitos comportamentais e microgliais da administração de
LPS no camundongo YAC128 da doença de Huntington**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.a, Dr.(a) Eloisa Pavesi

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.a, Dr.(a) Jade de Oliveira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr.(a) Viviane Polli

Dr.(a) Karine Roversi

Université de Montréal

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Neurociências.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a), Dr.(a) Patricia de Souza Brocardo

Orientador(a)

Florianópolis/SC, 2022.

Dedico esse trabalho a todas e todos que cruzaram meu caminho e a ele acrescentaram felicidade. À todas as mulheres negras que vieram antes de mim e me permitiram estar aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minhas amigas e amigos que desde sempre estiveram sendo meu pilar de apoio, sem vocês eu não estaria aqui, com certeza! Amigues do ensino fundamental, Mylla, Luana, Brenda e Luiz Felipe, obrigada por permanecerem há pelo menos 15 anos, vocês são parte fundamental de mim. Amigues do IFRN: Diana, Anny, Clarinha, Lorena, Carol, Alvinho, meus primos Cleyton, Cleyson e Millena, vocês atravessaram comigo uma fase da vida que moldou boa parte de quem sou, tudo fica melhor quando volto pra perto de vocês. Amigues da UFRN, principalmente Dayse e Jane, que merecem destaque especial porque a existência de vocês é especial demais na minha vida, e parte fundamental dessa minha caminhada, mas também não menos importante Elyelton por me permitir compartilhar a difícil jornada que é ser preta fazendo ciência, e existindo também, e pelos momentos de descontração, tornou vários dias mais fáceis. Gostaria também de agradecer a amigues de jornada, que ao longo da vida acrescentaram e muito ao meu caminho: Brenda Hannauana, Valdir Machado, Beatriz Garcez, Fabiani Triches, Junior, Candinho, Aline Matilde, Bruna Fragoso, Juliana Lyra, Lucas Dantas, Geraldo Matheus, Isabela Pinheiro, Maibe Beatriz, Dudu Quirino, cada um à sua forma, me ajudou a estar aqui e ir além, amo vocês!

Não posso deixar de citar minha amiga Yara Flores, que por anos foi uma amiga virtual e que mesmo assim esteve tão presente em cada passo que dei nessa

vida acadêmica, eu te amo, obrigada por acreditar em cada passo que eu dou, e tentar me fazer acreditar também.

A minha mãe, Milcem, que sempre fez o que pôde para me ajudar a seguir meus sonhos, inclusive este. E a meu pai, Anchieta, por sentir tanto orgulho de sua filha fazendo mestrado em Neurociências, que mesmo internado com COVID-19, doença que contraiu mesmo se cuidando ao máximo que podia, ficou falando com orgulho sobre mim para as enfermeiras que dele cuidavam.

A meu ex-namorado, Pedro Marconi, que aguentou comigo a distância, pandemia, e o mestrado. Que viveu comigo intensamente esse processo, obrigada pela paciência, carinho, reciprocidade e também pela ajuda nos experimentos. E a minha nossa gata Glia, por tornar, mesmo que inconscientemente, minha jornada mais leve.

A dona Sônia e Seu Elói, que me receberam como parte da família e me incentivaram como poucos!

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Neurociências da UFSC, que de maneira excepcional sempre buscou o melhor para os alunos.

A minhas colegas do LANEP, por todo suporte e aprendizados! Foi muito bom vivenciar um laboratório de mulheres! Em especial gostaria de agradecer a Anelise, quem compartilhou comigo a casa em alguns momentos, o peso do mestrado em outros, e a partir de agora quero compartilhar muitos momentos na minha vida, eu não tenho palavras para agradecer por permanecer comigo!

Gostaria também de agradecer aos colegas do Laboratório de Neurociência Translacional, principalmente ao Caibe por todo apoio e paciência em me ajudar com o PCR, e não poderia deixar de citar a Nicolle Platt, que fez eu me sentir em casa enquanto trabalhávamos juntas, e desabafávamos juntas, eu com certeza irei sentir saudade de me sentir em casa no teu abraço.

Ao demais laboratórios da UFSC também gostaria de agradecer por todo suporte dado para realizar alguns experimentos, como o laboratório da professora Patricia Stoco, Ana Lúcia, e o Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) e aos técnicos pela ajuda e ensinamentos.

Gostaria de deixar aqui meu muito obrigada a meus amigos do Instituto do Cérebro, em especial, Bruna Landeira, Larissa Araújo, Sérgio Rushi, Sara Maia, Juliana Brandão, aprendi com vocês coisas que me trouxeram até aqui, e que vão me permitir ir mais longe, mas sempre vou querer voltar para perto de vocês.

A meus amigos do LNC, um prazer ter vocês no meu caminho! Que muitos outros tenham tanta sorte de conhecerem vocês! Em especial a Professora Cecilia Hedin e meu querido Caio Oliveira, em breve nos encontraremos novamente!

A minha orientadora, Dra. Patricia Brocardo que, sem me conhecer muito bem, me aceitou em seu laboratório. Obrigada por ter me permitindo ir mais longe do que eu mesma poderia imaginar.

A minha co-orientadora, Dra. Manuella Kaster, que, com carinho e paciência, me ensinou bastante e me disponibilizou seu laboratório e diversos materiais para que eu pudesse realizar meus experimentos.

A meus professores da UFRN, em especial Jefferson, Thiago Severo e Antônio Marques Neto, eu não teria chegado aqui sem vocês. E vocês sabem muito bem disso, obrigada!

Also, thank you Dr. Talbot to received to me in his Lab and contributed in an incredible to this project and my background in science and life. All Talbot Lab, thank you to received me and teach me a lot, I'll never forget you, Jo, Theo, Moh, Ali, in special way Maryam, for all support, moments, sharing knowledge, I really will miss work with you, Maryam! Thanks a lot for everything! Summer students, especially Soeuchelle, Justin, Surbhi, thanks a lot for all good moments and laughs in the Lab or out, I wish you the best for your future, thanks for made Montreal experience so much better for me!

Aos brasileiros (e francesa quase brasileira) que tornaram Montreal minha casa Katiane, Karine, Natalia, Isley e Laurianne, eu vou sentir muita falta de dividir com vocês o peso que a vida acadêmica possui. Eu torço verdadeiramente para que nossos caminhos se cruzem sempre que possível, e quando não for possível, eu vou tentar fazer ser. Foi um privilégio esbarrar com vocês nessa cidade, muito obrigada por me acolherem e fazerem eu me sentir em casa. Eu amo vocês!

Agradeço também ao processo de expansão dos Institutos Federais dado em todo o país durante o governo Lula e Dilma, dessa forma pude ter, desde cedo, acesso à educação que me mostrou que meus sonhos podem sim se tornarem realidade.

A artistas como Emicida, Beyonce, BaianaSystem e nossa eterna Elza Soares, que mesmo sem saber, me ajudaram a pensar que eu poderia estar no pódio em algum momento.

Aos animais, que involuntariamente, doaram suas vidas. Fica aqui meu respeito e agradecimento!

A todas as mulheres que não desistiram de seus sonhos, e a todas as outras que tiveram seus sonhos roubados. A todas as mulheres negras que um dia foram impedidas de estudar, e a todas as outras que até hoje lutam contra um sistema que insiste em nos diminuir. Agradeço por lutarem. Lutamos juntas!

“Quando a mulher negra se movimenta, toda a estrutura da sociedade se movimenta com ela.”

Angela Davis

RESUMO

A doença de Huntington (DH) é uma doença neurodegenerativa rara de caráter hereditário, conhecida principalmente por seus sintomas motores e que ocorre por mutação da proteína Huntingtina (Htt). Na DH, anterior aos sintomas motores podem surgir sintomas cognitivos e psiquiátricos, tais como a depressão. A região encefálica mais afetada durante a progressão da doença é o estriado, mas também são vistas alterações em outras regiões como o hipocampo, região que se relaciona com os sintomas psiquiátricos presentes na doença. É visto que, também anterior ao surgimento dos sintomas motores, ocorre o aumento do número das células da microglia em sua forma ativada. A microglia é conhecida como o macrófago do Sistema nervoso central (SNC), e possui, entre outras diversas funções, a função de responder a estímulos que possam vir a ser danosos ao SNC. Neste trabalho propôs-se utilizar da neuroinflamação induzida por Lipopolissacarídeo (LPS) para avaliar as possíveis alterações dependente da presença ou não da mutação da Htt, e também alterações em marcadores microgliais. Para tanto, camundongos YAC128 e WT machos e fêmeas com 3 meses de idade receberam uma injeção aguda de LPS (0,5 mg/kg), e 24h após a injeção tiveram o comportamento analisado e material cerebral coletado para análises histológicas. Foi observado que o LPS, independente de genótipo, foi capaz de gerar um comportamento do tipo-ansioso nos camundongos, reduzindo o número de entradas dos animais no centro do campo aberto e também a distância percorrida. Além de ter induzido também um comportamento do tipo-depressivo, aumentando o tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado. Também foi visto o aumento do marcador CD68 nos animais YAC128 que receberam LPS. Para o marcador TMEM119 encontramos uma diferença de genótipo de forma que os animais YAC128 que receberam salina apresentam mais marcação do que os animais WT que também receberam salina. Nossos resultados apontam para uma real alteração de marcadores microgliais no hipocampo dos animais, com ou sem estímulo inflamatório gerado por LPS, e também reforçam os possíveis efeitos da inflamação no comportamento ansioso e depressivo dos animais.

Palavras-chave: Doença de Huntington. Neuroinflamação. Microglia.

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is a rare hereditary neurodegenerative disease, known mainly for its motor symptoms and which occurs by mutation of the Huntingtin protein (Htt). In HD, cognitive and psychiatric symptoms such as depression may appear prior to motor symptoms. The brain region most affected during disease progression is the striatum, but changes are also seen in other regions such as the hippocampus, a region that is related to the psychiatric symptoms present in the disease. It is seen that, also prior to the onset of motor symptoms, there is an increase in the number of microglia cells in their activated form. Microglia is known as the macrophage of the central nervous system (CNS), and has, among other functions, the function of responding to stimuli that may be harmful to the CNS. In this work, it was proposed to use Lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation to evaluate possible changes depending on the presence or absence of the Htt mutation, as well as changes in microglial markers. For this, male and female YAC128 and WT mice at 3 months of age received an acute injection of LPS (0.5 mg/kg), and 24h after the injection had their behavior analyzed and brain material collected for histological analysis. It was observed that LPS, regardless of genotype, was able to generate an anxious-like behavior in mice, reducing the number of animals entering the center of the open field and also the distance traveled. In addition to having also induced a depressive-like behavior, increasing the immobility time of the animals in the forced swimming test. An increase in CD68 marker was also seen in YAC128 animals that received LPS. For the TMEM119 marker, we found a genotype difference so that the YAC128 animals that received saline showed more marking than the WT animals that also received saline. Our results point to a real change in microglial markers in the hippocampus of animals, with or without inflammatory stimulus generated by LPS, and also reinforce the possible effects of inflammation on the animals' anxious and depressive behavior.

Keywords: Huntington's disease. Neuroinflammation. Microglia.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação dos níveis de penetrância em relação a indivíduos afetados e não afetados pela DH de acordo com o número de repetições CAG **24**
- Figura 2** - Representação da evolução do quadro sintomático da DH no modelo YAC128 **27**
- Figura 3** - Ressonância magnética no plano frontal de encéfalos de um indivíduo com a DH comparando com um indivíduo controle **29**
- Figura 4** - Representação de duas possíveis razões da diminuição de BDNF na DH **32**
- Figura 5** - Representação das possíveis vias de acesso da inflamação ao SNC **40**
- Figura 6** - Imunofluorescência com marcação para Iba1, destacando os diferentes estados morfológicos da microglia **42**
- Figura 7** - Ilustração acerca dos estados de reação microglial **43**
- Figura 8** - Subtipos microgliais **44**
- Figura 9** - Resumo esquemático dos achados sobre alterações inflamatórias periféricas em estudos de DH em modelos animais e humanos **47**
- Figura 10** - Representação do gel de agarose produzido para realização da genotipagem dos animais **53**

Figura 11 - Representação esquemática dos grupos experimentais	54
Figura 12 - Representação da linha do tempo do protocolo experimental	55
Figura 13 - Resultados do teste do campo aberto	62
Figura 14 - Resultado sobre o tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado	65
Figura 15 - Resultados do <i>Splash test</i>	66
Figura 16 - Imunofluorescência para marcadores microgliais TMEM119 e CD68	68
Figura 17 - Imunofluorescência de TMEM119 e CD68 no hipocampo.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Peso corporal dos animais	61
Tabela 2 – Resumo dos resultados obtidos	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BACHD – do inglês *Bacterial Artificial Chromosome*

BDNF – do inglês *Brain Derived Neurotrophic Factor*

BHE – Barreira Hematoencefálica

BrdU – 5-bromo-2'-deoxiuridina

CCL2 – Ligante 2 de quimiocina de motivo C-C

CRE – do inglês *cAMP responsible element*

DAMPs – do inglês *Damage-associated molecular pattern molecules*

DH – Doença de Huntington

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EROs – Espécies reativas de oxigênio

ERONs – Espécies reativas de nitrogênio

GCL – Camada Granular

GD – Giro denteado

Htt – Huntingtina

IL-4, 6, 8, 10 – Interleucina 4, 6, 8, 10

iPSC – do inglês *Induced pluripotent stem cell*

iPSC-NSC – do inglês *Induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells*

LPS – Lipopolissacarídeo

mHtt – Huntingtina mutada

mGlu R1/5 – Receptores Metabotrópicos de Glutamato do Grupo 1

NSC – do inglês *Neural Stem Cells*

OH8 dG – 8-hidroxi-2-desoxiguanosina

PAMPs – do inglês *Pathogen-associated molecular pattern molecules*

PCR – do inglês *Polymerase chain reaction*

PET – do inglês *Positron Emission Tomography*

PSD95 – Proteína de Densidade Pós-Sináptica de 95 kD

SNC – Sistema nervoso central

TBS – Teste de borrifagem de sacarose

TBZ – Tetrabenazina

TLR4 – do inglês *Toll-Like Receptor 4*

TNF – Teste do nado forçado; Fator de necrose tumoral

VMAT2 – do inglês *Vesicular monoamine transporter 2*

YAC128 – do inglês *Yeast Artificial Chromosome*

3-NT – 3-Nitrotirosina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	DOENÇA DE HUNTINGTON	22
1.2	MODELOS DE ESTUDO DA DH	24
1.3	NEUROLOGIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	27
1.3.1	Alterações motoras	32
1.3.2	Sintomas psiquiátricos	33
1.3.3	Sintomas cognitivos	34
1.4	TRATAMENTOS PARA A DH	35
1.5	O PAPEL DO HIPOCAMPO NA DH	36
1.6	NEUROINFLAMAÇÃO NA DH	38
1.7	MODELO DE NEUROINFLAMAÇÃO	47
2	JUSTIFICATIVA	50
3	OBJETIVOS	51
3.1	OBJETIVO GERAL	51
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1	ANIMAIS	52

	GENOTIPAGEM	52
4.3	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	54
4.4	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL	56
4.4.1	Atividade locomotora	56
4.4.2	Teste de Borrifagem de Sacarose (TBS)	56
4.4.3	Teste do Nado Forçado (TNF)	57
4.5	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA	57
4.5.1	Processamento do tecido encefálico	57
4.5.2	Imunofluorescência para avaliar características microgliais	58
4.5.3	Análise morfológica	59
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
5	RESULTADOS	61
5.1	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO LPS E DO GENÓTIPO NO PESO DOS ANIMAIS	61
5.2	AVALIAÇÃO DA LOCOMOÇÃO E DO COMPORTAMENTO DO TIPO- ANSIOSO	61
5.3	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DO TIPO-DEPRESSIVO	65
5.4	AVALIAÇÃO DA ANEDONIA DOS ANIMAIS	66

5.5	AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA MICROGLIAL	67
5.6	QUANTIFICAÇÃO DA IMUNOFLOURESCÊNCIA DE MARCADORES MICROGLIAIS	69
6	DISCUSSÃO	71
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	79
8	REFERÊNCIAS	81

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE HUNTINGTON

A doença de Huntington (DH) é uma doença neurodegenerativa progressiva com padrão de herança autossômico dominante que ocorre por uma mutação no gene que codifica a proteína Huntingtina (Htt) (ROOS et al., 2010). Durante o século 19 vários médicos já haviam se atentado para uma coréia hereditária, entretanto a descrição feita por George Huntington fez com que a doença levasse seu nome (WALKER, 2007). Essa mutação resulta numa expansão da sequência de trinucleotídeos CAG, responsável pela transcrição dos resíduos de glutamina no terminal amínico da proteína Htt (*HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP*, 1993). Cabe destacar que a Htt é expressa normalmente em células neuronais e não-neuronais, e durante o desenvolvimento embrionário exerce papel fundamental (GIL; REGO, 2008), sendo que a inativação do gene que codifica a proteína Htt resulta na morte do embrião (ZEITLIN et al., 1995).

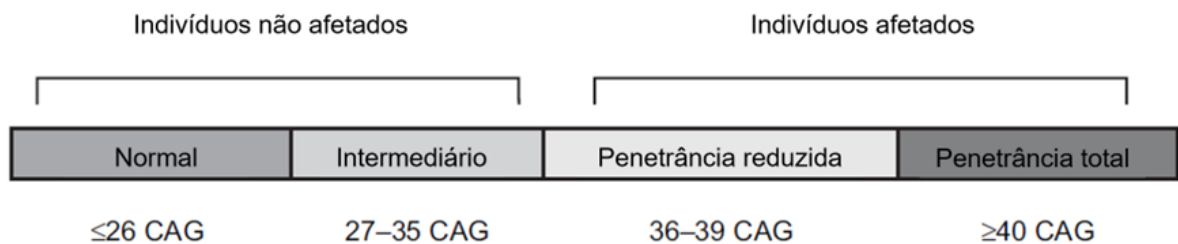
A DH é caracterizada por distúrbios motores associados à perda da coordenação voluntária do movimento (GIL; REGO, 2008). Embora a Huntingtina mutada (mHtt) seja expressa durante toda a vida, na maioria dos casos, o aparecimento dos primeiros sintomas surgem apenas na idade adulta, entre os 35 e 50 anos de idade (*HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP*, 1993), sendo fatal de 15 a 20 anos após o aparecimento dos primeiros sintomas motores (HO et al., 2001). No entanto, apesar desta ser a forma mais comum da doença, os sintomas dos pacientes podem surgir de maneira precoce ou tardia

(WALKER, 2007), dependendo do número de repetições CAG e do ambiente, como dieta e estresse (MO et al., 2015).

Além dos sintomas motores, depressão, irritabilidade e agressividade são sintomas neuropsiquiátricos prevalentes na DH (VAN DUJIN et al., 2014). A presença da depressão é de 50% ou mais em pacientes com a DH, e, frequentemente, diagnosticada anos antes do desenvolvimento de sintomas motores (DU; PANG; HANNAN, 2013). Um agravante do quadro depressivo em pacientes da DH é o suicídio, tendência já relatada por Huntington em 1872. Entre pacientes com a DH a causa de morte por suicídio é quatro vezes maior do que na população geral (FARRER, 1986).

O número de repetições CAG considerado normal situa-se entre 9 e 34, enquanto na DH o número de repetições é geralmente maior que 40. Os indivíduos assintomáticos possuem menos de 35 repetições CAG. Alelos com 35 a 39 repetições CAG estão associados com as formas mais tardias da doença; porém, uma penetrância incompleta tem sido observada em certos casos que não apresentam sintomas ou sinais neuropatológicos (SEMANKA et al., 2006). Alelos com 40 a 50 repetições dão origem à forma adulta da DH, enquanto repetições mais longas estão associadas ao aparecimento dos primeiros sintomas muito precocemente, sendo responsáveis pelos casos juvenis e infantis, mais severos e raros (BRINKMAN et al., 1997, SEMANKA et al., 2006) (Figura 1).

Figura 1 - Representação dos níveis de penetrância em relação a indivíduos afetados e não afetados pela DH de acordo com o número de repetições CAG.



Os níveis de penetrância da Huntingtina mutada (mHtt) variam de acordo com a quantidade de repetições da sequência de trinucleotídeos CAG. Fonte: Adaptada de SEMAKA et al., 2006.

Estima-se que 2,7 a cada 100.000 habitantes em todo o mundo e que 10 a cada 100.000 habitantes na Europa tenham DH (BRADY, 2019). Apesar de apresentarem as maiores taxas de pesquisas relacionadas à DH, Estados Unidos, França e Canadá não lideram os números de casos da DH no mundo. Na verdade, o Egito é o país que mais apresenta prevalência de DH no mundo, sendo em torno de 21 a cada 100.000 habitantes. Como dito anteriormente, a DH é uma doença hereditária, podendo explicar assim o porquê dos altos números de casos da doença no Egito, país que apresenta altas taxas de consanguinidade (MANSOUR et al., 2010).

1.2 MODELOS DE ESTUDOS DA DH

Existem alguns modelos de animais transgênicos para o estudo da DH, tais como os camundongos R6/1 e o R6/2 (MANGIARINI et al., 1996). Os animais R6/1 apresentam 67 aminoácidos do fragmento N-terminal (Htt humana) com 116 repetições CAG, apresentam déficits de aprendizagem, comportamento do tipo-depressivo nas fêmeas, assim como comportamento do tipo-ansioso, e também apresentam uma redução de células cerebelares, além das estriatais (DENNY et al., 2010; POULADI; MORTON; HAYDEN, 2013).

Já os animais R6/2 parecem apresentar instabilidade no número de repetições CAG, apresentando 67 aminoácidos do fragmento N-terminal (Htt humana) com aproximadamente 144 repetições CAG. Os animais deste modelo apresentam déficit de aprendizado, e também características periféricas como atrofia dos músculos (POULADI; MORTON; HAYDEN, 2013). Ambos modelos desenvolvem os sintomas motores com aproximadamente 7 - 8 semanas de idade, e morrem nas 7 semanas seguintes (LÜESSE et al., 2001), apresentando 2-3 semanas de sintomas severos (MANGIARINI et al., 1996). Dessa forma, esses modelos podem não se adequar a estudos que desejam observar períodos que antecedem os sintomas motores, já que a janela temporal é bastante curta.

Outro modelo de camundongo que pode ser utilizado para estudar a DH é o BACHD (do inglês: *Bacterial Artificial Chromosome*), modelo que apresenta a Htt humana completa, com 97 repetições CAG. Assim como os animais R6/1, é visto um comportamento do tipo-depressivo nos camundongos BACHD, e também a presença

do comportamento do tipo-ansioso (POULADI; MORTON; HAYDEN, 2013; GRAY et al., 2008).

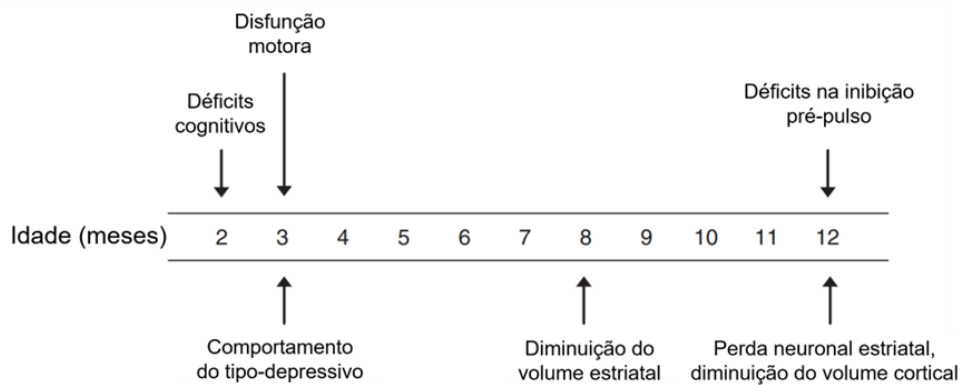
Um modelo bastante utilizado para estudar os efeitos da mutação na Htt é o do camundongo YAC128 (*Yeast Artificial Chromosome*), modelo que expressa a mHtt humana, possuindo em torno de 128 repetições CAG. O camundongo YAC128 é um bom modelo para o estudo da DH, iniciando seus sintomas de hipercinesia com 3 meses, seguido de déficit motor com 6 meses, e progressão aos 12 meses com hipocinesia (SLOW et al., 2003). Entretanto, antes mesmo dos sintomas motores, os camundongos YAC128 apresentam sintomas pré-motores como déficits cognitivos e comportamento do tipo-depressivo (Figura 2). Com 9 meses de idade apresenta atrofia estriatal, e aos 12 meses, atrofia cortical (SLOW et al., 2003). Por características como essas, os camundongos YAC128 são considerados o melhor modelo para o estudo de DH, apresentando neuropatologia e progressão lenta como a observada na DH humana.

Existem também os modelos *knock-in* para a DH, onde os animais carregam dentro do seu gene Htt a mutação. Esse modelo, por utilizar do contexto genômico e proteico do próprio animal, consegue trazer consigo uma melhor relação entre alterações causadas pela mutação e o que seria de comportamento/características normais do animal (MENALLED, 2005).

Além dos modelos animais modificados geneticamente, também existem os modelos químicos. Como por exemplo o modelo 3-NP (do inglês: *3-nitropropionic*

acid), que age como toxina irreversível na mitocôndria, reduzindo a produção de ATP, e fazendo surgir rapidamente lesões no estriado dos animais, similares as que surgem na DH e em seus demais modelos (CHOI et al., 2009).

Figura 2 - Representação da evolução do quadro sintomático da DH no modelo YAC128



A linha do tempo demonstra que a partir dos 2 meses de idade os camundongos YAC128 apresentam alterações cognitivas, e que após o terceiro mês se iniciam as disfunções motoras e o comportamento do tipo-depressivo. A diminuição do volume estriatal e cortical iniciam após o oitavo e décimo segundo mês, respectivamente. Fonte: Adaptada de POULADI et al., 2009.

1.3 NEUROLOGIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

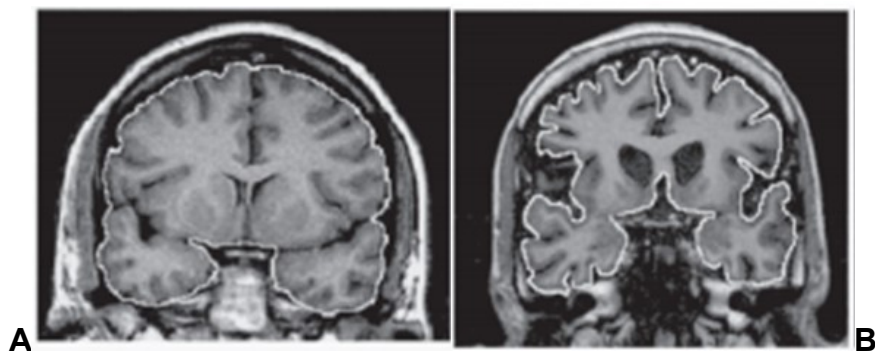
Na DH ocorre a formação de agregados de mHtt, os quais interagem com diversas outras moléculas, como por exemplo, ativadores transcricionais, podendo interromper assim o processo de transcrição de proteínas, como por exemplo as transcrições mediadas por CRE (do inglês: *cAMP responsible element*) (TAKAHASHI

et al., 2010). Esses agregados podem afetar as funções celulares normais, levando as células à morte (DAVIES et al., 1997). Todavia, alguns trabalhos vêm discutindo o possível efeito protetor de agregados de poliglutaminas (SARKAR; RUBINSZTEIN, 2008), por exemplo, já foi visto que agregados mHTT poliubiquitinados, ou seja, mHtt com várias cadeias do sinalizador de degradação ubiquitina, tenham um papel protetor na HD, auxiliando a polimerização de mHTT para reduzir a presença de oligômeros tóxicos (VALIONYTE et al., 2020).

A neuropatologia da DH é caracterizada pela atrofia do estriado (GIL; REGO, 2008), região formada pelo núcleo caudado e pelo putâmen, e relacionada com o planejamento e execução do comportamento motor (PAULI et al., 2016). Em crianças que carregam a mutação, mas que ainda não apresentam nenhuma manifestação da DH, já é visto diferenças na trajetória do desenvolvimento do volume estriatal e do globo pálido, dando indícios que na DH antes mesmo da neurodegeneração é apresentado um desenvolvimento neural anormal, podendo se dar pela presença da mHtt ou também pela ausência da Htt (VAN DER PLAS et al., 2019). Até 95% dos neurônios do estriado são do tipo espinhoso médio, neurônios GABAérgicos, que se projetam do estriado para o globo pálido e para porção reticular da substância negra (KEMP; POWELL, 1971). Devido à morte desses neurônios observa-se uma redução acentuada do neurotransmissor GABA, principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC), em todos os núcleos de base, principalmente no núcleo caudado e putâmen. Os terminais axônicos dos neurônios GABAérgicos causam, normalmente, inibição do globo pálido e na substância negra. Acredita-se

que esta perda de inibição possibilite surtos espontâneos de atividade nesses dois núcleos, o que causam os movimentos involuntários (CROSSMAN et al., 1988). Nas fases mais avançadas da doença a disfunção intracelular induzida pela mHtt conduz à degeneração de vias neuronais importantes e à perda celular no estriado, no córtex cerebral e em outras regiões encefálicas (ROSAS et al., 2002; MANN; OLIVER; SNOWDEN, 1993; HEINSEN et al., 1994).

Figura 3 – Ressonância magnética no plano frontal de encéfalos de um indivíduo controle comparado com um indivíduo com a DH



Ressonância magnética coronal mostrando a redução do volume encefálico de controle (A) e um paciente com DH (B). Fonte: Adaptada de RUOCCO et al. 2006.

Apesar de não resultarem necessariamente de um efeito direto da proteína mutante, os mecanismos de desregulação metabólica, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, diminuição de neurotrofinas, apoptose e autofagia têm sido implicados na patologia da DH (CHENG et al., 2016; ZUCCATO; CATTANEO, 2007;

BRENNAN et al., 1985). Muitos destes mecanismos desenvolvem-se lentamente, tornando-se mais evidentes em fases mais tardias da doença. Estes mecanismos podem mesmo ocorrer em paralelo, promovendo-se mutuamente e culminando na morte neuronal (ZHENG et al., 2018).

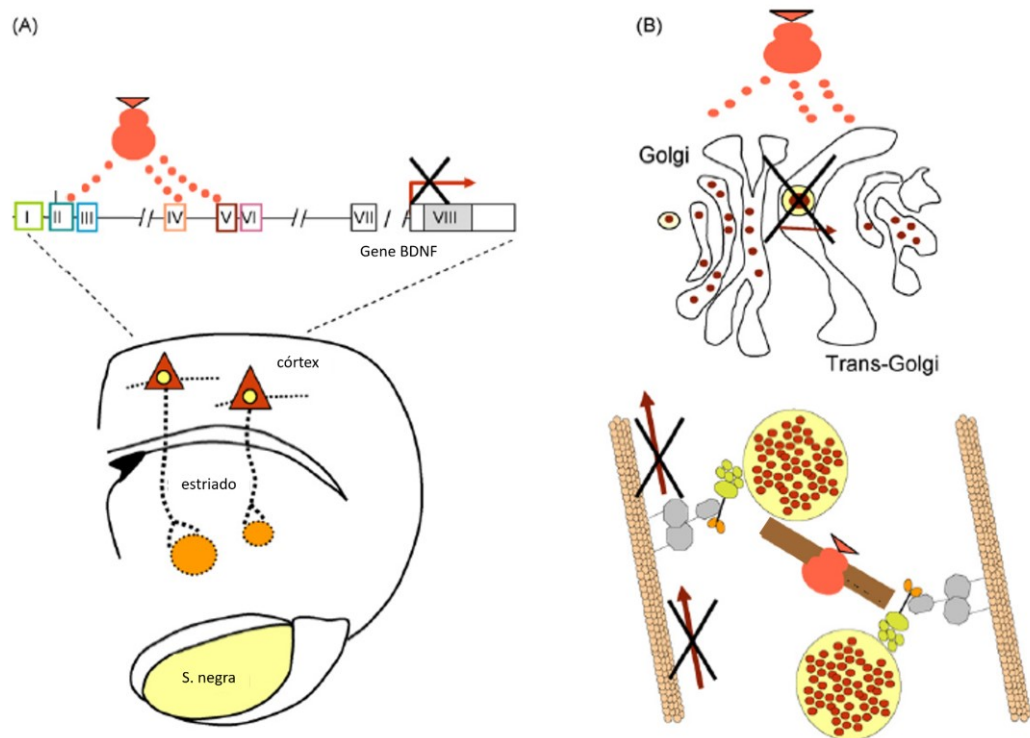
Durante a progressão da DH, já foi visto o aumento de 3-Nitrotirosina (3-NT), um marcador de nitração proteica, no cérebro de pacientes da doença (BROWNE et al., 1999), indicando assim um possível aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) no ambiente celular (FENG; WEN; LU, 2019). Ainda em estudo com amostras de pacientes da DH, foi visto o aumento de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (OH8 dG), um marcador de estresse oxidativo em ácido nucleico, no córtex parietal (POLIDORI et al., 1999). Na DH já foram observados danos associados a EROs em proteínas (GUPTA et al., 2021), resultando na morte celular e também danos no DNA, antes mesmo da presença dos agregados proteicos, como visto por Illuzzi et al., (2009) nos camundongos R6/2.

Outra característica da neuropatologia da DH é a excitotoxicidade glutamatérgica. No cérebro de modelos murinos da DH é visto um desequilíbrio da atividade estriatal mediada por receptores de glutamato e dopamina (SEPERS; RAYMOND, 2014). Acredita-se que a mHtt interaja com os receptores de glutamato, levando assim ao aumento do glutamato no ambiente celular, e como consequência da toxicidade, a morte neuronal. A morte celular nesse caso pode acontecer pelo aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , depois de sua entrada pelo canal do receptor NMDA. Assim, enzimas ativadas por cálcio, como proteases, endonucleases

e fosfolipases, vão contribuir para a degradação de diferentes componentes celulares e morte neuronal (SÁNCHEZ et al., 2008).

Já foi visto em pacientes e em modelos animais da DH a redução da neurotrophina encefálica derivada do encéfalo (BDNF, sigla em inglês de *Brain Derived Neurotrophic Factor*) (CATTANEO; ZUCCATO; TARTARI, 2005). O BDNF é uma proteína conhecida por seu envolvimento na regulação e plasticidade de sinapses em diversas regiões do encéfalo (BRAMHAM; MESSAOUD, 2005). Como citado anteriormente, o estriado é a região encefálica mais afetada na progressão da DH, entretanto, é relatado que o estriado não produz o BDNF e, portanto, o BDNF chega ao estriado por meio de transporte anterógrado em vias aferentes vindas do córtex, por meio da via córtico-estriatal (ZUCCATO et al., 2001; BAQUET; GORSKI; JONES; 2004). Existe um conjunto de dados na literatura que sugere que a mHtt atua na produção correta do BDNF e seu envio anterógrado, enquanto que na DH ocorreria uma diminuição dos níveis de mRNA no córtex cerebral, região que enviaria o BDNF para o estriado, justificando a redução dos níveis nesta região (Figura 3, a). Porém, outros dados sugerem que a Htt atua no transporte do BDNF do córtex para o estriado, assim, a mHtt interferiria no transporte do BDNF, resultando assim em sua redução no estriado (ZUCCATO; CATTANEO, 2007) (Figura 3, b).

Figura 4 – Representação de duas possíveis razões da diminuição de BDNF na DH



Representação de dois possíveis motivos de redução de BDNF no estriado durante a DH. A) redução da transcrição de BDNF (níveis de RNAm); B) Redução da tradução (níveis da proteína) e do movimento das vesículas. S. Negra: Substância Negra; Trans-Golgi: Região Trans do Complexo de Golgi. Adaptado de: ZUCCATO; CATTANEO, 2007.

1.3.1 Alterações motoras

Como previamente destacado, um dos sintomas mais clássicos da DH é a coreia, entretanto esse estágio é antecedido por sintomas cognitivos e psiquiátricos já relatados em pacientes (THOMPSON et al., 2012), que serão melhor descritos nos

tópicos seguintes. As alterações motoras são caracterizadas principalmente pelo aumento de movimentos involuntários, que se tornam generalizados, abruptos e descontrolados, podendo afetar assim cada vez mais atividades comuns do dia a dia dos pacientes, como andar, comer e engolir (ESTRADA-SÁNCHEZ; REBEC, 2013). Os sintomas motores da DH podem ser divididos em duas categorias: ações involuntárias adicionadas, como a coreia, e movimentos voluntários prejudicados, como por exemplo o ato de andar e manipular objetos, ocorrendo a piora de ambos com a progressão da doença (NOVAK; TABRIZI, 2010).

1.3.2 Sintomas psiquiátricos

Como citado, os sintomas neuropsiquiátricos antecedem os sintomas motores. As taxas de prevalência de transtornos psiquiátricos ao longo da vida entre pacientes com DH variam entre 33% e 76% (PAOLI et al., 2017). Esses sintomas podem ser apresentados como apatia, irritabilidade e depressão (THOMPSON et al., 2012). Apesar de ser vista uma diferença de prevalência de sintomas psiquiátricos dependente de estágio da DH, não é vista uma diferença dependente de sexo (DALE et al., 2016). Apesar de ser vista uma diferença da prevalência dos sintomas psiquiátricos como a depressão, dependente de estágio da doença, não é vista uma diferença dependente de sexo (DALE et al., 2016).

A depressão é vista como o sintoma psiquiátrico mais comum na DH (GUBERT et al., 2020), entretanto é visto que os sintomas depressivos aparecem cerca de 14 anos após a média de início da depressão em pacientes sem DH (de Souza, 2015).

Outro dado interessante é que a depressão está mais presente na população geral em pessoas do sexo feminino, enquanto que essa diferença não é vista em estudos com pacientes da DH (PAOLI et al., 2017). A depressão é um importante fator de risco para o suicídio. Avaliando as taxas de suicídio nos pacientes da DH encontramos que no geral, 20 a 30% dos pacientes endossam a ideação suicida durante a vida, enquanto 7 a 10% tentam o suicídio durante a vida, em comparação com 1 a 3% de tentativas na vida na população mundial (NOCK et al., 2008a; KACHIAN, et al., 2019). Apesar da depressão ser vista como um dos sintomas que mais pode afetar diretamente a vida do paciente e também de familiares, outros sintomas psiquiátricos como comportamento violento ou agressivo, comportamento perseverativo/obsessivo e psicose podem ser suficientes para afetar o trabalho ou a vida diária (MCALLISTER et al., 2021).

1.3.3 Sintomas cognitivos

Assim como os sintomas neuropsiquiátricos, os sintomas cognitivos também antecedem os sintomas motores. A velocidade de processamento pode ser um parâmetro utilizado para visualizar possíveis alterações cognitivas em pacientes, e para tal podem ser utilizadas diferentes abordagens. Essa combinação de testes cognitivos clínicos e experimentais são selecionados com base em estudos anteriores em animais e humanos, para serem sensíveis a danos nos gânglios da base ou DH (PAULSEN et al., 2006). Tais testes podem ser, por exemplo: velocidade motora, onde se pode avaliar o toque rápido, medidas de velocidade psicomotora, tempo de reação, reconhecimento facial e de emoções e funções executivas. Utilizando desses testes

citados acima, foi possível identificar diferenças entre pacientes DH e indivíduos controle (PAULSEN et al., 2006). Além disso já foram vistas alterações no reconhecimento de emoções, variável entre as possíveis emoções apresentadas aos pacientes, como por exemplo o reconhecimento de nojo, raiva e tristeza (JOHNSON et al., 2007).

Já em animais são vistos resultados em camundongos YAC128, mostrando um declínio cognitivo no modelo, quando comparado a animais selvagens, no aprendizado do Rotarod, em tarefas de natação e habituação do campo aberto em diferentes idades (RAAMSDONK et al., 2005), indicando assim um déficit cognitivo dependente da mutação que o modelo apresenta. Porém, os YAC128 são animais gerados a partir da linhagem FVB/N, que apresentam uma redução da capacidade visual com 1 mês de vida (CHANG et al., 2002); objetivava-se caracterizar esses déficits no nosso modelo, entretanto, com essa limitação, ainda se faz necessário buscar outros meios para avaliar melhor essas características cognitivas.

1.4 TRATAMENTOS PARA A DH

Não existe cura para a DH, ou um tratamento que fará com que a doença regride ou não avance mais, entretanto existem alguns medicamentos que são utilizados para oferecer uma melhor qualidade de vida ao paciente, voltado para algum sintoma específico. Um medicamento bastante utilizado pelos pacientes da DH é a

tetrabenazina e a deutetrabenazina, que são utilizados para suprimir os movimentos involuntários de espasmos e contorções (coreia) associados à doença.

Apesar de não ter seu mecanismo muito bem esclarecido, acredita-se que o efeito anti-coreia da tetrabenazina seja devido a uma depleção reversível de monoaminas, como dopamina, serotonina, norepinefrina e histamina dos terminais nervosos (LUNDBECK, 2015). Já a deutetrabenazina é um inibidor reversível do VMAT2 (do inglês *vesicular monoamine transporter 2*), que preferencialmente reduz a liberação de dopamina ao inibir a captação nas vesículas pré-sinápticas. As densidades do VMAT2 são mais altas no caudado, putâmen e núcleo accumbens. Como a tetrabenazina, a deutetrabenazina também não possui mecanismo esclarecido de como melhora a coreia através da inibição do VMAT2, entretanto, pode-se suspeitar que a interação entre o caudado e o putâmen esteja diretamente relacionada ao efeito clínico (DEAN; SUNG, 2018).

1.5 O PAPEL DO HIPOCAMPO NA DH

Conhecido por fazer parte do sistema límbico (RANSOME et al., 2012) e seu envolvimento com a memória (OLTON et al., 1979), o hipocampo possui uma das duas áreas capazes de gerar novos neurônios na vida adulta no cérebro, a região conhecida como Giro Denteado (GD) (Altman; Das, 1965). As células recém geradas no hipocampo podem ser chamadas de Células tronco neurais (NSC), e apresentam uma capacidade de renovação e multipotência (GAGE, 2000). Utilizando do análogo

de timidina (5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU)) em roedores, já é relatado a presença de NSC na zona subgranular subjacente à Camada Granular (GCL) do hipocampo (BONAGUIDI et al., 2011; PRAAG et al., 2002; ERIKSSON et al., 1998). Estudos com os camundongos YAC128 (Simpson et al., 2011) e os camundongos R6/2 (GIL et al., 2005), modelos animais para o estudo da DH, já demonstraram alterações na neurogênese hipocampal adulta, sendo vista uma redução na neurogênese, utilizando do marcador Ki-67, em estágios iniciais e mais avançados da doença no modelo animal.

Apesar de ser geralmente associado a memórias episódicas e/ou memória de longo prazo, tem sido vista uma participação do hipocampo em circuitos de memórias cognitivas mais flexíveis, que podem ser definidas como processo adaptativo de gerar, modificar e integrar informações passadas em resposta às demandas do ambiente (RUBIN et al., 2014). Em estudos com R6/1 é visto que os animais modelo da DH não apresentam a mesma resposta à novidade no teste de reconhecimento de objetos quando comparados aos animais selvagens, e também não apresentam a mesma resposta no teste T-maze, explorando de maneira igual todos os braços do aparato. Além disso, esses mesmos animais apresentam menor expressão da Proteína de Densidade Pós-Sináptica de 95 kD (PSD95), proteína relacionada com a atividade sináptica das células, e também redução no número de espinhos dendríticos (MIGUEZ et al., 2015).

Outra prova do envolvimento do hipocampo na DH é que esse também sofre atrofia na DH, visto em cérebro *post-mortem* de pacientes (DE LA MONTE et al., 1988;

ROSAS et al., 2003). Em testes utilizando do labirinto aquático de Morris virtual, pacientes da DH, quando comparados a pacientes controles, apresentaram aprendizado prejudicado para encontrar a plataforma oculta (BEGETI et al., 2016).

Uma característica importante do hipocampo, é sua relação com sintomas psiquiátricos como a depressão, frequentemente presente na DH (PAULSEN et al., 2001). Estudos clínicos de neuroimagem demonstraram que indivíduos com depressão recorrente apresentavam densidade reduzida de massa cinzenta no córtex temporal esquerdo, inclusive no hipocampo (SHAH et al., 1998) e uma redução do volume hipocampal (SCHMAAL et al., 2016). Além disso, em modelos animais, o estresse crônico, que geralmente está associado a sintomas de depressão em animais e em humanos, resulta frequentemente em atrofia neuronal do córtex pré-frontal e do hipocampo (MURROUGH et al., 2017).

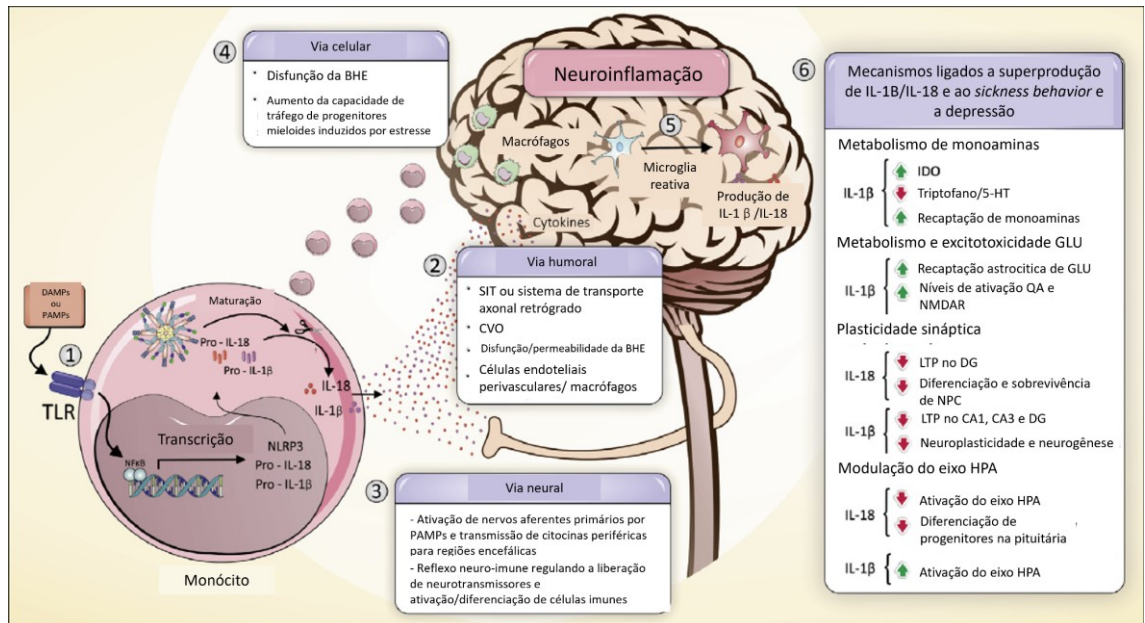
1.6 NEUROINFLAMAÇÃO NA DH

O sistema imunológico inato desenvolve uma resposta inflamatória como intenção de proteger o corpo quando reconhece alguma possível ameaça. Essa resposta vai desde liberação de sinalizadores moleculares, à migração de tipos celulares como leucócitos para o local de ação (LYMAN et al., 2014). Os sinais que podem desencadear uma resposta inflamatória são diversos, como moléculas associadas a dano celular chamadas de DAMPs (Do inglês *damage-associated molecular pattern molecules*), ou moléculas associadas a patógenos, chamadas de

PAMPs (Do inglês *Pathogen-associated molecular pattern molecules*), como o Lipopolissacarídeos (LPS).

A inflamação se torna uma neuroinflamação quando a resposta para conter a infecção ou dano celular ocorre no tecido nervoso. Apesar da existência da Barreira-Hematoencefálica (BHE) mediadores inflamatórios periféricos e células imunes pode chegar ao SNC por meio de três caminhos: pela (i) via humoral, onde as citocinas periféricas podem acessar o SNC através do sistema de transporte axonal retrógrado, podendo interromper a permeabilidade da BHE; (ii) via neural, onde PAMPs e citocinas liberadas ativam nervos aferentes primários, como o nervo vago, que pode transmitir sinais do sistema imunológico periférico para o cérebro, o que gera uma resposta em diversas áreas cerebrais relacionadas à regulação do humor; (iii) e a via celular, onde monócitos ativados periféricos podem atravessar uma BHE disfuncional (KAUFMANN et al., 2017) (Figura 4). Uma vez no SNC essas respostas geram uma neuroinflamação, caracterizada pelo aumento na reatividade de células da microglia e astrócitos, produção de citocinas e com impacto nos mecanismos de neuroplasticidade e sobrevivência neuronal.

Figura 5 – Representação das possíveis vias de acesso da inflamação ao SNC



Representação das possíveis vias de acesso da inflamação ao SNC, gerando assim uma neuroinflamação. Adaptado de: Kaufmann et al., 2017.

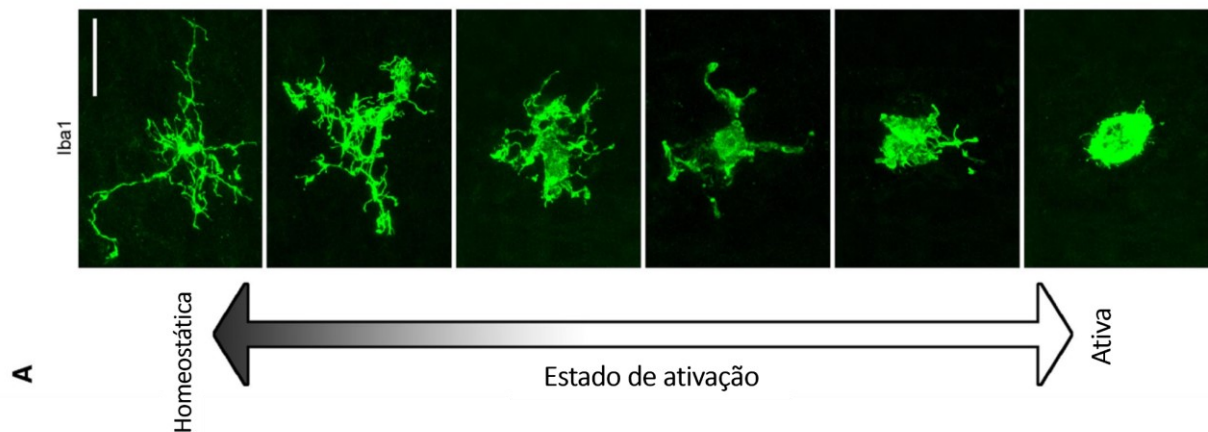
Dessa forma, a neuroinflamação pode ser definida como o conjunto de respostas imunes do SNC, diferindo da inflamação periférica, além de outros fatores, pelo envolvimento das células da microglia (LYMAN et al., 2014). A microglia é a principal célula imune presente no SNC, e exerce a função de proteção seja por meio de processos como fagocitose, eliminação de debris celulares, agregados proteicos, ou liberação de citocinas (TAI et al., 2007). Contudo, a microglia está envolvida em diversas funções celulares, incluindo plasticidade sináptica, remodelamento sináptico, entre outros (ABIEGA et al., 2016; SALTER; STEVENS, 2017). Também se sabe que

a microglia participa durante o desenvolvimento saudável na regulação do número de precursores neurais durante o desenvolvimento do córtex cerebral (CUNNINGHAM et al., 2013).

Vale salientar que a reatividade e a morfologia microglial mudam em decorrência de processos inflamatórios. Assim, caracteriza-se a microglia homeostática e com função de vigilância do parênquima encefálico aquela com morfologia mais alongada e com processos mais longos, enquanto a microglia no seu estado ativado possui uma forma mais amebóide e diminuição no tamanho de seus processos (EYO; DAILEY, 2013; STRATOULIAS et al., 2019) (Figura 5), apesar de algumas ressalvas que podem ser feitas, a ideia desses estados da microglia ajudam a direcionar as pesquisas nesse campo.

Como dito, o fenótipo microglial se altera de acordo com o ambiente no qual a célula se encontra, dessa forma, alguns marcadores podem passar a serem expressos somente nos momentos nos quais a microglia se encontra no estado conhecido como ativado. Por exemplo, o marcador Iba1 é conhecido por marcar células microgliais mas também macrófagos periféricos, já o marcador CD68 também marca ambos os tipos celulares, entretanto somente no estado ativado das células. O marcador conhecido por TMEM119, como o Iba1, marca as células microgliais independentemente do estado fenotípico da célula, entretanto, diferente do Iba1, marca somente células microgliais, excluindo assim macrófagos periféricos de sua marcação.

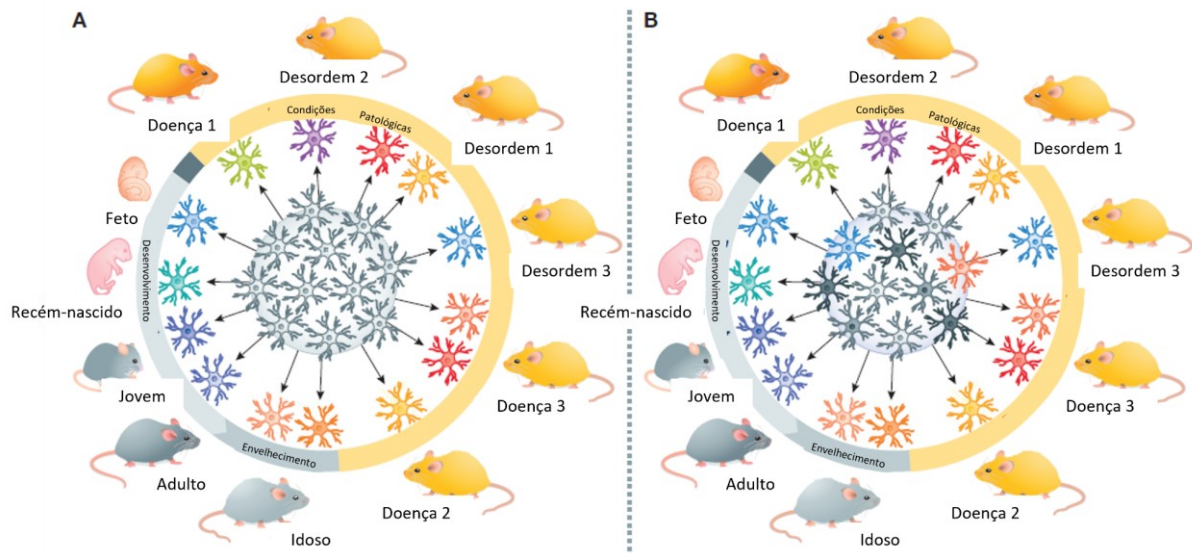
Figura 6 – Imunofluorescência com marcação para Iba1, destacando os diferentes estados morfológicos da microglia



Representação dos possíveis estados de ativação das células microgliais, imunohistoquímica com marcação para Iba1. Adaptado de: CUNNINGHAM et al., 2013.

Durante muito tempo extrapolou-se para a nomenclatura microglial termos utilizados para diferenciar os macrófagos periféricos, como os termos M1 para macrófagos com perfil pró-inflamatório, e M2 para macrófagos com perfil anti-inflamatório. Entretanto hoje em dia assume-se esses termos não cabem as células microgliais, foi observada em diferentes modelos animais de doenças e em estudos *post-mortem* uma coexistência dos diversos perfis de expressão dessas células, ou seja, dependendo dos estímulos ambientais e dos níveis transcricionais e metabólicos, por exemplo, a microglia assumirá características diferentes que poderão influenciar no ambiente celular (PAOLICELLI et al., 2022) (Figura 6).

Figura 7 – Ilustração acerca dos estados de reação microglial

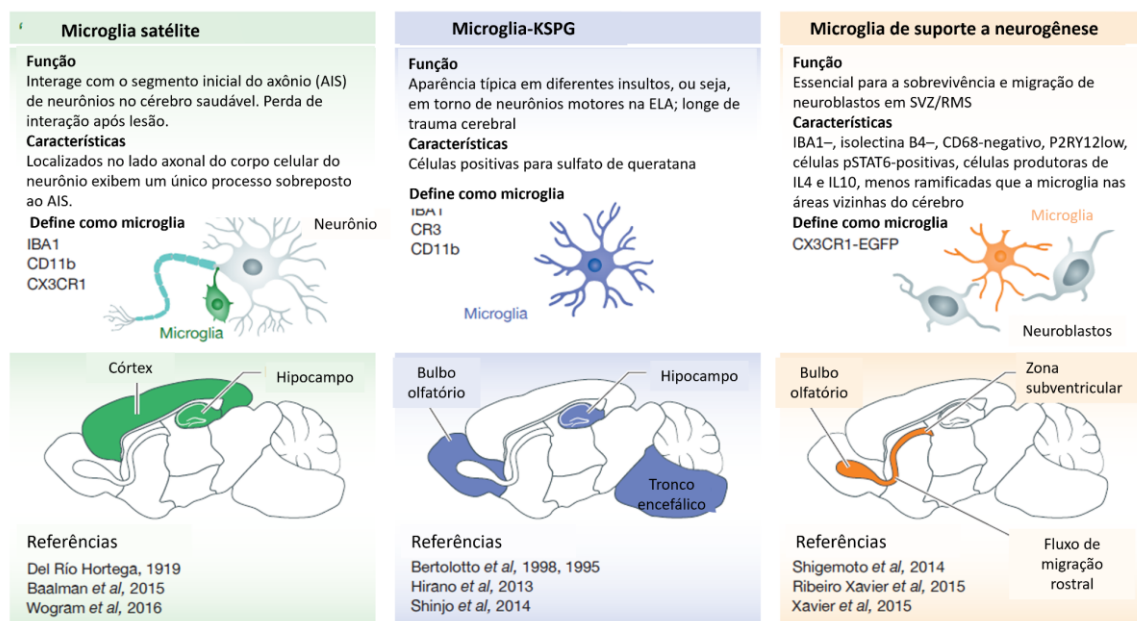


Representação de como a resposta microglial ao ambiente foi e é vista. A) Microglia é considerada como uma população homogênea e altamente plástica, capaz de responder a estímulos ambientais de diversas maneiras. B) População microglial heterogênea, com propriedades intrínsecas e especializações funcionais. Adaptado de: STRATOULIAS et al., 2019.

Como dito anteriormente, o estado homeostático da microglia varia no microambiente que ela se encontra no SNC, isso porque já é visto que essa célula, dependendo da região cerebral onde se encontra, pode apresentar um perfil molecular diferente. Essa diferenciação de subtipos microgliais pode ser feita com base na expressão gênica e também nos marcadores moleculares a quais elas respondem (STRATOULIAS et al., 2019) (Figura 7). Por exemplo, no hipocampo são encontradas as chamadas Microglia Satélite, que vão interagir com o segmento inicial do axônio de neurônios no cérebro saudável, já na SVZ vão ser encontradas as chamadas

Microglia de suporte a Neurogênese, células essenciais para a sobrevivência migração de neuroblastos.

Figura 8 – Subtipos microgliais



Representação de alguns dos subtipos microgliais propostos pela literatura, baseados em achados genômicos, morfológicos e funcionais únicos. Adaptado de: STRATOULIAS *et al.*, 2019.

Estudos apontam para a relação entre neuroinflamação e a DH, por exemplo, por meio de análises de imunohistoquímica é visto um aumento de marcadores de ativação microglial, como T β 4 (Timosina β -4), no córtex pré-frontal em tecido encefálico *post-mortem* de indivíduos com a DH (SAPP *et al.*, 2001). Além disso,

estudos *in vivo* com indivíduos com a DH demonstraram por meio de escaneamento PET (do inglês: *Positron Emission Tomography*) que a ativação microglial em áreas corticais e subcorticais é um evento que antecede os sintomas motores na DH (TAI et al., 2007), além de marcadores inflamatórios periféricos, podendo estar presente até 15 anos antes das manifestações neurológicas (BJÖRKQVIST et al., 2008).

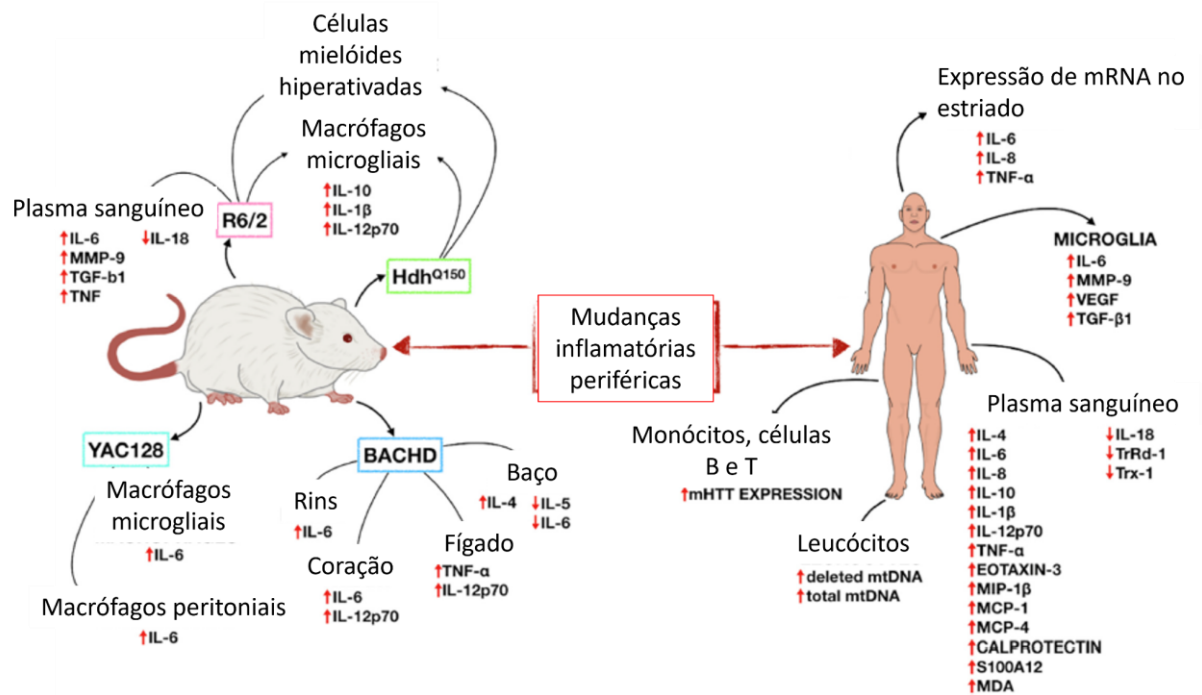
A mHtt também é expressa na microglia (5 a 13%) (LAWSON et al., 1990) e isso pode conferir um aumento na expressão de fatores pró-inflamatórios, observada nos monócitos de pacientes pré-sintomáticos e na microglia de modelos animais da DH (BJÖRKQVIST et al., 2008). Suspeita-se que a exacerbação da reatividade microglial pode estar envolvida na progressão de doenças neurodegenerativas (ROSI et al., 2006). A microglia presente no estriado dos camundongos YAC128 possui uma diminuição no número de projeções quando comparada aos animais selvagens (FRANCIOSI et al., 2012), indicando assim que essa microglia se encontra mais ativa nesse modelo.

Estudos têm verificado níveis de citocinas tanto em pacientes quanto em modelos animais para a DH. Chang et al., (2015), verificaram níveis mais elevados de interleucina (IL)-6 no plasma do modelo R6/2 desde o estágio sintomático inicial (9, 11 e 13 semanas), quando comparados aos irmãos da mesma ninhada. Entretanto, encontraram níveis mais baixos de IL-18 entre esses dois grupos. O mesmo foi observado por Disatnik et al., (2016), com o acréscimo do aumento de fator de necrose tumoral (TNF) que também foi observado.

Em pacientes já foi vista a redução de IL-18 no plasma de pacientes da DH quando comparados aos controles (CHANG et al., 2015). Trabalho realizado com duas coortes de pacientes com média de idade: 46 anos para controles, 41 para pré-manifestos e pacientes em HD (coorte 1) - 52 anos para controles, 45 para pré-manifesto e 55 para pacientes em HD precoce (coorte 2)]. Assim como também já foi visto o aumento das citocinas IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α no plasma de pacientes à medida que a DH avança (BJÖRKQVIST et al., 2008). O mesmo grupo também fez análise de tecido *post mortem* e encontraram aumento na expressão de RNAm de IL-6, IL-8 e TNF- α no estriado dos pacientes. Para acompanhar a progressão da doença, pode ser utilizado cinco graus, chamados graus de Vonsattel, que vão de 0 a 5, designados em ordem crescente de gravidade (VONSATTEL et al., 1985). De acordo com Silvestroni et al., (2009), utilizando da técnica de PCR, também foi visto um aumento de mediadores de inflamação IL-10 e CCL2 (Ligante 2 de quimiocina de motivo C-C) no estriado de pacientes no nível de gravidade mais alto, enquanto não foi vista diferença no córtex e cerebelo.

Dessa forma podemos ver que o processo de neuroinflamação está presente na DH, tanto em modelos animais quanto em pacientes, com marcadores centrais e periféricos, e indicam sua participação no desenvolvimento e progressão da doença (VALADÃO et al., 2020) (Figura 8).

Figura 9 – Resumo esquemático dos achados sobre alterações inflamatórias periféricas em estudos de DH em modelos animais e humanos



Evidências relatadas na literatura para alterações vistas na DH relacionadas a respostas inflamatórias periféricas. A) Respostas vistas em camundongos, B) Respostas vistas em pacientes. Adaptado de: VALADÃO, et al., 2020.

1.7 MODELO DE NEUROINFLAMAÇÃO

Dentre alguns modelos que podem ser utilizados para gerar processos neuroinflamatórios nos modelos animais, o LPS é frequentemente utilizado. O LPS é um polissacarídeo encontrado na membrana externa de bactérias gram negativas (AN et al., 2020), que é reconhecido pelo receptor *Toll-Like Receptor 4* (TLR4). Após o

reconhecimento do LPS pelo receptor, ocorre a dimerização do receptor na membrana celular, e se inicia a cascata de interações proteína-proteína levando à produção de citocinas pró-inflamatórias, iniciando assim o processo inflamatório (KUZMICH et al., 2017).

Já é visto também que, mesmo em pouca quantidade, é possível que o LPS cruze a BHE (BANKS; ROBINSON, 2010), podendo ser uma das vias que leva a ativação das células microgliais (AI et al., 2005), e também o desenvolvimento do chamado *sickness behavior*, que pode ser definido como um conjunto de alterações no comportamento dos animais, geralmente relacionado a uma redução da ingestão de alimentos (AUBERT et al., 1997), redução da atividade locomotora e exploratória (LINTHORST et al., 1995), mas que não excede 24 horas (LASSELIN et al., 2020).

É bem documentado que o estímulo periférico de LPS pode produzir efeitos no SNC (CATORCE; GEVORKIAN, 2016). Alguns estudos apontam diferenças em marcadores moleculares e bioquímicos após o estímulo com LPS em camundongos, por exemplo aumento de IL-6 e IL-1 β mRNA e proteína (GODBOUT et al., 2005), e também de TNF- α (QIN et al., 2007). Também são vistas alterações a nível celular, com o aumento do marcador astrocitário GFAP (Sofroniew et al., 2015), e, como já citado anteriormente, alterações microgliais, seja na morfologia, número, ou liberação de citocinas (CATORCE; GEVORKIAN, 2016). Dessa forma, unindo as características neuroinflamatórias já apresentadas pelos pacientes da DH e a progressão que a doença apresenta, nos perguntamos se poderia esse processo

neuroinflamatório exacerbar ou antecipar características microgliais e comportamentais que o modelo YAC128 apresenta.

2. JUSTIFICATIVA

Para tratar uma doença progressiva debilitante e que carece de estratégias farmacológicas e não-farmacológicas de intervenção, se faz necessário entendê-la. Dessa forma, estudos que evidenciam a caracterização do modelo animal já nas fases mais iniciais se fazem importantes no processo. Além disso, tendo em vista o papel da inflamação na progressão dos processos neurodegenerativos, o uso do LPS (0,5 mg/kg) para induzir a inflamação no modelo animal YAC128 para a DH torna possível a investigação de possíveis alterações em respostas microgлияis nesse modelo. A dose de LPS foi definida após resultados observados em um experimento piloto, onde foi testada uma dose de 1 mg/kg, e depois 0,5 mg/kg. Entender as ações de um agente inflamatório como o LPS no comportamento dos camundongos YAC128, e também as possíveis alterações microgлияis hipocampais, podem ajudar na caracterização da neuroinflamação na DH, aumentando o número de estudos sobre a relação de neuroinflamação e processos neurodegenerativos, auxiliando na elaboração de estratégias capazes de minimizar o avanço dos processos neurodegenerativos, podendo retardar a progressão.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL: Investigar o envolvimento da inflamação nos déficits motores e psiquiátricos, e na ativação da microglia hipocampal no modelo animal YAC128 da DH.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar alterações comportamentais dependente de genótipo e do LPS;
- Verificar se ocorre alteração no peso dependente de genótipo e LPS;
- Avaliar alterações microgliais dependente de genótipo e do LPS.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

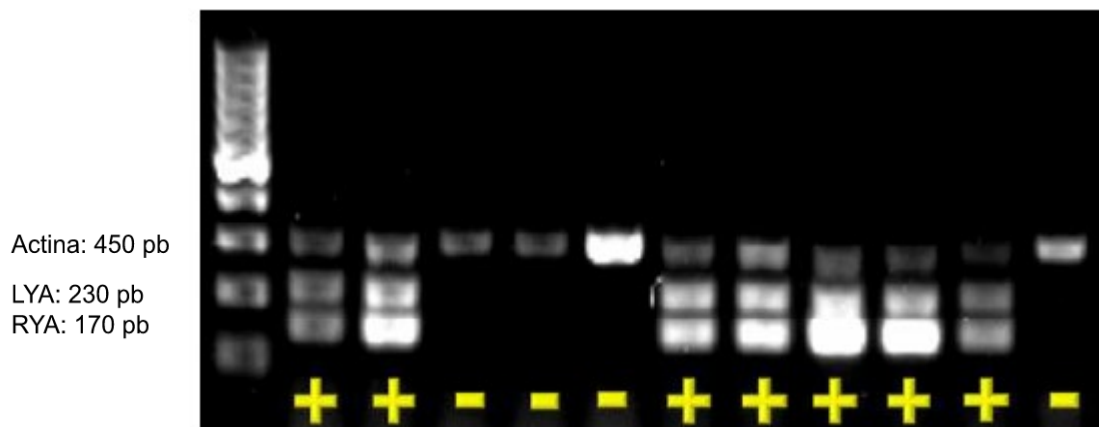
Animais transgênicos (YAC128) e selvagens de ambos os sexos, com idade de 3 meses foram utilizados no protocolo deste estudo. A colônia destes animais foi mantida em gaiolas opacas de plástico (30 x 20 x 13 cm) com 6 animais/caixa no biotério setorial do Departamento de Bioquímica na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, 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).

4.2 GENOTIPAGEM

Os animais YAC128 foram gerados por acasalamentos entre YAC128 e animais selvagens (FVB/N), dessa forma, alguns animais foram positivos para a mutação (YAC128) e outros selvagens, sendo necessária assim a genotipagem para a correta identificação dos animais. Brevemente, as amostras de tecido foram coletadas e incubadas em 300µL de solução de lise por 3 horas a 55°C. Após a extração de DNA, 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, foram adicionados 2 µL de cada amostra de DNA (volume final: 10 µL). Os primers que foram utilizados para a identificação do genótipo são o LYA (*left YAC arm*), RYA (*right YAC arm*) e actina: LYA1 = 5' CCTGCTCGCTTCGCTACTTGGAGC 3', LYA2 = 5'

GTCTTGCGCCTTAAACCAACTTGG 3', RYA1 = 5'
 CTTGAGATCGGGCGTTCTGACTCGC 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, aparelho disponibilizado pelo LAMEB (Laboratório Multiusuários de
 Estudos em Biologia) (Figura 10).

Figura 10 - Representação do gel de agarose produzido para realização da genotipagem dos animais

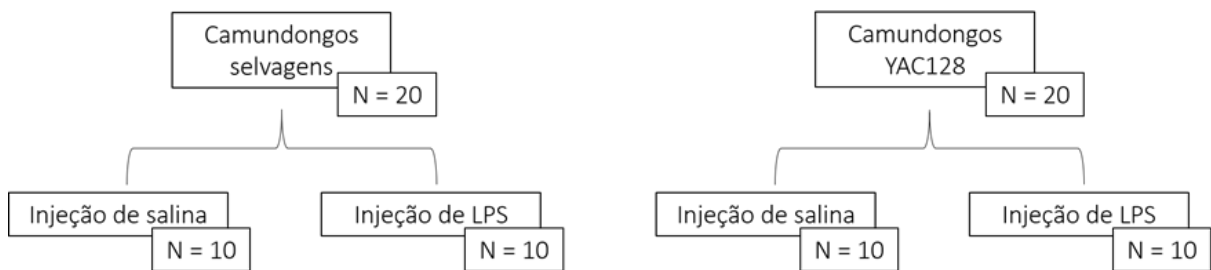


Os símbolos (+) indicam animais positivos para a mutação (YAC128) e o (-) indicam animais negativos para a mutação (selvagens, WT). De cima para baixo, a primeira banda é a actina (450 pb), sendo o nosso controle positivo. As duas marcações seguintes representam a mutação presente nos camundongos transgênicos, LYA (230 pb) e RYA (170 pb). Fonte: os autores.

4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Aos 3 meses de idade os camundongos selvagens (FVB/N) e YAC128 (machos e fêmeas) foram separados em dois grupos (Figura 11): (i) Controle (salina), (ii) LPS (LPS 0,5 mg/kg, i.p.).

Figura 11 - Representação esquemática dos grupos experimentais



Os animais foram randomicamente divididos em 4 grupos aos 3 meses de idade: Camundongos selvagens veículo (NaCl 0,9%) e lipopolissacarídeo (LPS), e camundongos YAC128 veículo e LPS.

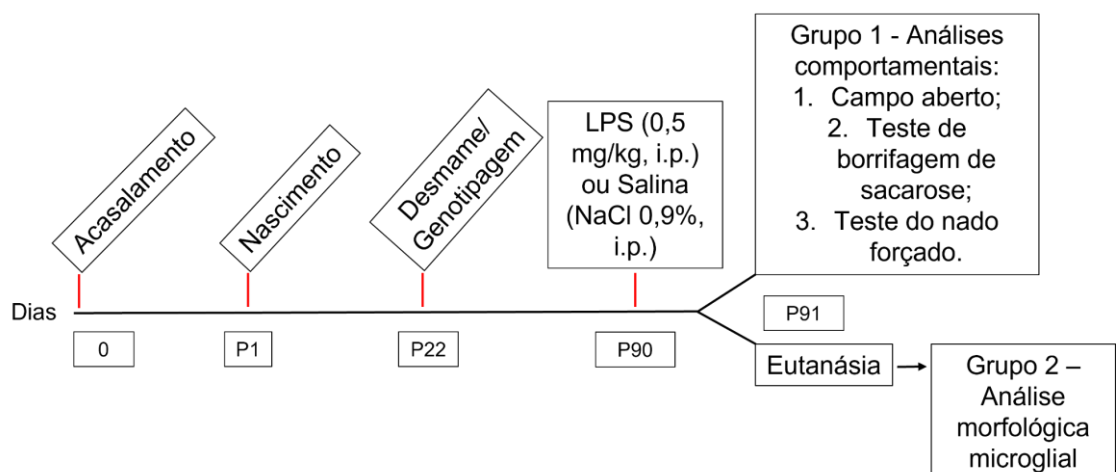
Fonte: Os autores, 2020.

A administração do extrato de lipopolissacarídeo (LPS) da bactéria gram-negativa Escherichia coli (0,5 mg/kg, i.p.), sorotipo O111:B4 (L630-25MG; Sigma, St. Louis, MO), foi aguda e após 24 horas os animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais para avaliação motora e do comportamento tipo-depressivo e do tipo-ansioso. Para definição da dose utilizada, foi feito um teste piloto, primeiramente com a dose de 1mg/kg, entretanto os machos utilizados, 24h após a

injeção, apresentavam um comportamento que não nos permitia comparar com os das fêmeas, tendo em vista que eles passavam todo o tempo de todos os testes parados, sem responder a nenhum estímulo, fosse ele o ambiente para explorar ou a borrifagem de sacarose.

Imediatamente após o término dos testes comportamentais, foi feita a eutanásia dos animais. Dois grupos de animais foram utilizados. Os animais do grupo 1, foram utilizados para análises comportamentais. Enquanto os animais do grupo 2 foram eutanasiados 24h após a injeção de LPS ou veículo, perfundidos com solução salina seguida de paraformaldeído 4% e os encéfalos foram preparados para a análise histológica, congelados a -80°C e cortados no criostato ($30\ \mu\text{m}$) (Figura 12).

Figura 12 - Representação da linha do tempo do protocolo experimental.



Representação da linha do tempo do protocolo experimental. Fonte: Os autores, 2020.

4.4 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

4.4.1 Atividade Locomotora

Proposto inicialmente por Hall (1936), o teste de campo aberto foi utilizado para mensurar a atividade locomotora dos animais. Os animais foram colocados individualmente em uma arena de madeira (40 x 60 x 50 cm). Cada animal permaneceu no aparato por um período de 6 minutos. Os parâmetros de distância total percorrida, tempo gasto no centro e na periferia foram avaliados pelo software ANY-maze® (Stoelting, Wood Dale, IL USA). O aparato foi limpo com solução etanol 10% a cada sessão a fim de evitar resíduos olfatórios capazes de gerar interferência no comportamento dos animais.

4.4.2 Teste de Borrifagem de Sacarose (TBS)

O TBS, previamente descrito por (ISINGRINI et al., 2010), constitui-se como um marcador comportamental de autocuidado e anedonia em animais. Em nosso estudo o TBS foi utilizado para investigar os efeitos da inflamação sobre o comportamento hedônico. O teste consiste em borrifar uma solução 10% de sacarose no dorso do camundongo e alocá-lo em cilindro transparente por 5 minutos. Os animais foram ambientados no cilindro sem sacarose por 5 minutos para que pudessem explorar e reconhecer o local. Após a ambientação os animais foram borrifados no dorso com a solução de sacarose. Devido a viscosidade da solução de sacarose, e ao comportamento instintivo dos animais, o tempo total de autolimpeza (unidade de medida em segundos) do nariz, face e corpo foram mensurados como

índice de autocuidado (KASTER et al., 2015). O aparato foi limpo com solução etanol 10% a cada sessão a fim de evitar resíduos olfatórios. Todas as sessões foram filmadas e avaliadas posteriormente.

4.4.3 Teste do Nado Forçado (TNF)

Para acessar o comportamento tipo-depressivo, de acordo com o proposto por Porsolt et al. (1977), utilizamos do teste do nado forçado. Assim, os animais foram colocados individualmente em tanques cilíndricos de policloreto de vinila com 24 x 10 cm de altura x diâmetro contendo água até 19 cm de altura mantida em $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Os testes foram gravados e posteriormente foram contabilizados a latência para a primeira imobilidade e o tempo total de imobilidade durante 6 minutos. Os camundongos foram considerados imóveis quando flutuarem, executando movimentos apenas para manter a cabeça fora da água. Diminuição no tempo de imobilidade é um indicativo de efeito tipo-antidepressivo, enquanto um aumento neste tempo é considerado efeito tipo-depressivo (CAN et al., 2012).

4.5 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

4.5.1 Processamento do tecido encefálico

Passadas 24h da injeção de LPS ou veículo, os animais do grupo 2 foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.) e perfundidos com solução salina (NaCl 0,9%), seguida de paraformaldeído 4%. Os encéfalos foram

removidos da calota craniana e ficaram por 24h em solução de paraformaldeído 4%, e depois foram colocados em solução de sacarose a 30%. Após a saturação, cortes seriados de 30 μ m de espessura foram feitos utilizando o criostato (Cryostat, Leica CM1850 UV, CA), o processo de corte dos encéfalos foi feito na Université de Montreal (UdeM), no Laboratório do Professor Dr. Sébastien Talbot. As fatias que possuíam o hipocampo ou o estriado foram coletadas em 1/5 séries.

4.5.2 Imunofluorescência para avaliar as características microgliais

Assim como os cortes, o protocolo de imunofluorescência também foi desenvolvido no Laboratório do Professor Dr. Sébastien Talbot (UdeM). Para identificar a morfologia microglial, utilizamos de co-marcação de imunofluorescência para TMEM119, marcador de células microgliais, e CD68, marcador de macrófagos ativadas e células microgliais. O antígeno foi recuperado e bloqueado como dito acima, seguido pela incubação por 48h do anticorpo policlonal de *rabbit* TMEM (Abcam, CA, cat. #209064, diluição 1:1000) e anticorpo monoclonal de *rat* CD68 (Abcam, CA, cat. #53444 diluição 1:1000). Após 48h os cortes foram lavados e incubados com anti-*rabbit* Alexa Fluor 647 (Invitrogen, CA, cat. #A21245, diluição 1:500), anti-*rat* Alexa Fluor 488 (Invitrogen, CA, cat. #A11006, diluição 1:500), por 24h a 4°C, seguido por lavagem e incubação com DAPI (Invitrogen, Thermo Fisher, CA, cat. #D1306, diluição 1:2000), por 10 minutos em temperatura ambiente. Os cortes serão lavados e montados com FluoromountG (Invitrogen, Thermo Fisher, CA, cat. #E141200). As imagens das lâminas marcadas foram feitas no aumento de 20x com

resolução de 4503 x 4503 pixels no microscópio invertido Nikon Eclipse Ti2 (Nikon Instruments Inc, Melville, NY).

Para avaliar a expressão dos marcadores microgliais TMEM119 e CD68 cortes seriados contendo o hipocampo de -1.46mm posterior ao Bregma a -2.30mm posterior ao Bregma (Franklin e Paxinos, 2001), foram processados. As lâminas preparadas tiveram a fluorescência analisada, de área de tamanho semelhante em todas as amostras.

4.5.3 Análise morfológica

As análises morfológicas foram feitas por um experimentador cego para as identidades das amostras na microscopia de fluorescência (Nikon Eclipse Ti2). Uma série de 5 fatias ao longo do eixo dorso-frontal do hipocampo foram utilizadas e as células TMEM119 e CD-68 positivas presentes ao longo do hipocampo tiveram sua morfologia analisada. A análise da ativação da microglia foi feita por meio da densidade óptica avaliando fluorescência dos marcadores utilizados, utilizando software imageJ (Wayne, National Institute of Mental Health, USA), definindo uma área de tamanho semelhante em todas as imagens para posterior análise.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram avaliados no software GraphPad por análise de variância (ANOVA) de duas vias com múltipla comparação pelo teste post-hoc de

Tukey, quando apropriado. O valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo, e os resultados foram expressos como média e erro padrão da média.

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO LPS E DO GENÓTIPO NO PESO DOS ANIMAIS

Tabela 1 - Peso corporal dos camundongos

	Salina				LPS			
	WT		YAC128		WT		YAC128	
	<i>Antes</i>	<i>Depois</i>	<i>Antes</i>	<i>Depois</i>	<i>Antes</i>	<i>Depois</i>	<i>Antes</i>	<i>Depois</i>
Peso corporal (g)	25,90 ± 0,7063	25,60 ± 0,7483	26,10 ± 0,7951	26,30 ± 0,8950	24,30 ± 0,6155	22,70* ± 0,7157	27,80 ± 0,8406	24,90** ± 0,8226

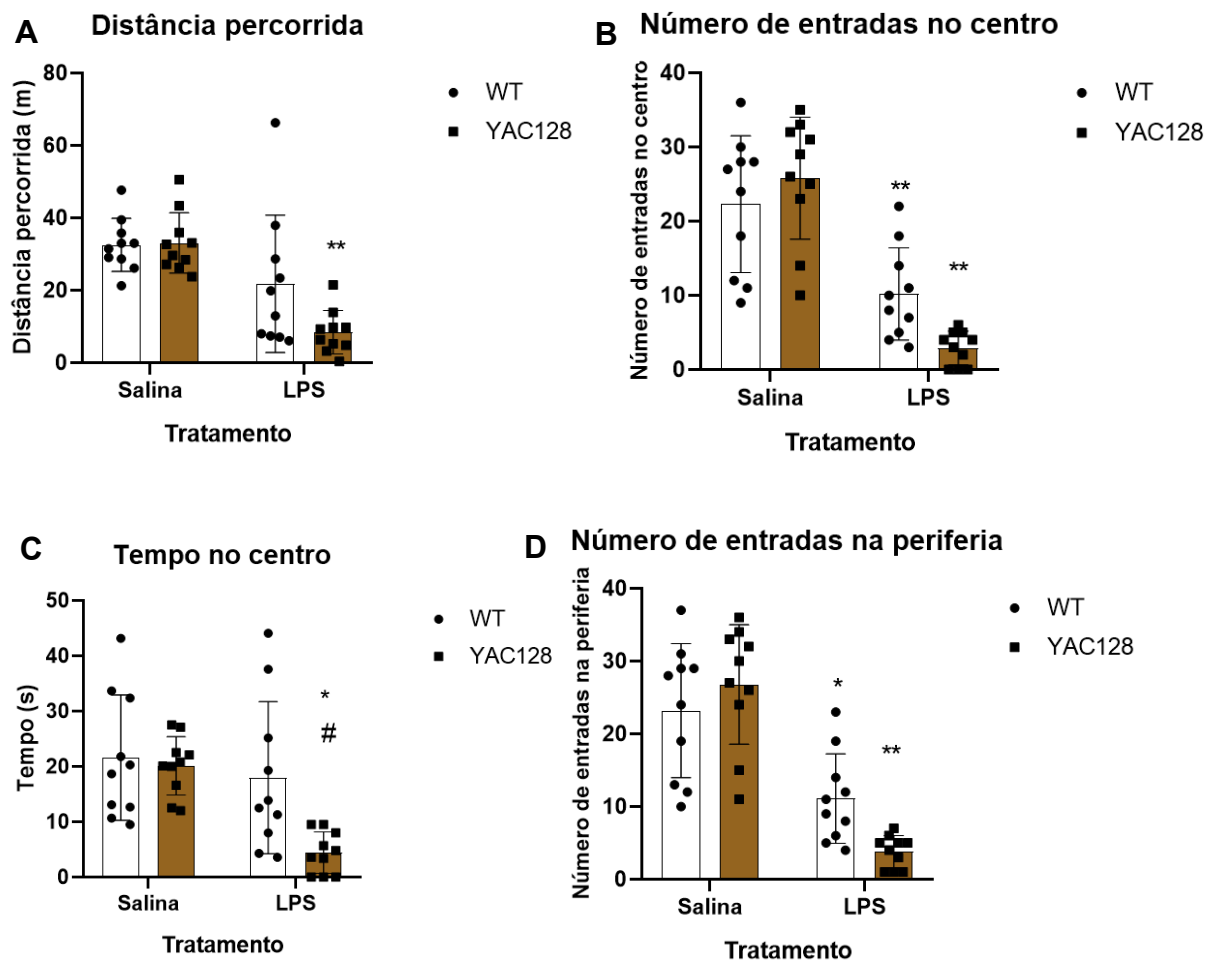
Legenda: Tabela representando o peso (g) dos animais antes e após a administração de LPS ou salina, N: 10. Os dados representam a média ± EPM.

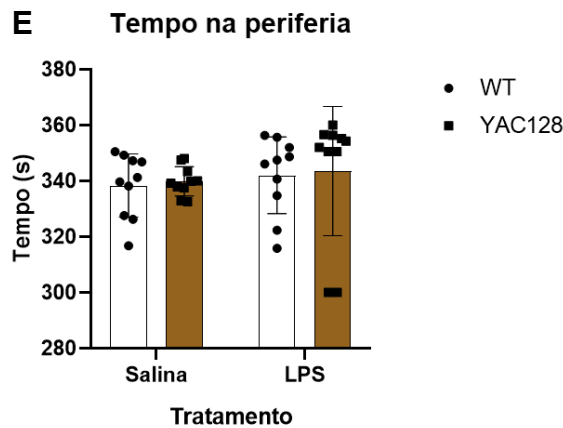
Avaliando a variação do peso dos animais 24h após a injeção, encontramos que os animais selvagens [F (3, 36) = 3,101; P=0,0002] e também os YAC128 [F (3, 36) = 3,101; P<0,0001] apresentaram uma perda significativa de peso, com diferença significativa também na interação entre os fatores [F (3, 36) = 16,21; P<0,0001] e do fator tempo, ou seja, antes e 24h após a injeção [F (1, 36) = 44,29; P<0,0001].

5.2 AVALIAÇÃO DA LOCOMOÇÃO E DO COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO

Para analisar a locomoção e o comportamento do tipo-ansioso utilizamos o teste do campo aberto. Uma diminuição do tempo no centro do aparato geralmente reflete um comportamento do tipo-ansioso (BAILEY; CRAWLEY, 2009).

Figura 13 – Resultados do teste do campo aberto





Resultados do teste do campo aberto. Número de entradas no centro (a) distância percorrida, (b) tempo de permanência no centro, (c) tempo no centro, (d) número de entradas na periferia, (e) tempo de permanência na periferia. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ representando a diferença dependente de tratamento. # $p < 0,05$ representando a diferença dependente de genótipo. Os dados representam a média \pm E.P.M.

A distância percorrida é um parâmetro que podemos avaliar no teste do campo aberto para verificar a atividade locomotora dos animais. Utilizando da ANOVA de duas vias foi vista a redução da distância percorrida dependente de tratamento [$F(1, 36) = 24,25$; $P < 0,0001$], mas não foi vista uma diferença de genótipo em resposta ao LPS [$F(1, 36) = 3,195$; $P = 0,0823$] e de interação [$F(1, 36) = 3,715$; $P = 0,0619$] (Figura 13, a).

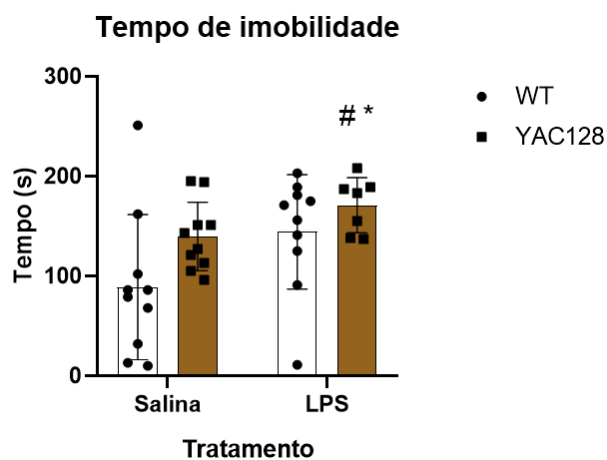
Na análise do número de entradas no centro foi encontrada uma diferença de tratamento [$F(1, 36) = 62,28$; $P < 0,0001$], mas não de genótipo [$F(1, 36) = 0,7342$; $P = 0,3972$] (Figura 13, b). Também foi visto uma diferença significativa na interação genótipo x tratamento [$F(1, 36) = 5,930$; $P = 0,0200$].

Ainda analisando o comportamento do tipo-ansioso, verificou-se por meio de uma ANOVA de duas vias uma diferença significativa no tempo de permanência no centro do aparato entre os grupos que receberam diferentes tratamentos [$F(1, 36) = 10,35$; $P=0,0039$]. Também foi vista uma diferença de genótipo nos animais que receberam LPS [$F(1, 36) = 6,270$; $P=0,0149$] (Figura 13, c). Entretanto não foi vista uma diferença significativa na interação genótipo x tratamento [$F(1, 36) = 4,029$; $P=0,0523$].

Uma diferença significativa entre os tratamentos avaliando o número de entradas na periferia [$F(1, 36) = 63,08$; $P<0,0001$], e uma diferença na interação genótipo x tratamento [$F(1, 36) = 6,083$; $P=0,0185$] foi encontrada (Figura 13, d). No entanto, não foi encontrada diferença significativa do genótipo [$F(1, 36) = 0,1035$; $P=0,7495$], do tratamento [$F(1, 36) = 0,6048$; $P=0,4418$] ou interação [$F(1, 36) = 1,816e-005$; $P=0,9966$] (Figura 13, e) quando analisado o tempo gasto na periferia do campo aberto.

5.3 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DO TIPO-DEPRESSIVO

Figura 14 – Resultado sobre o tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado



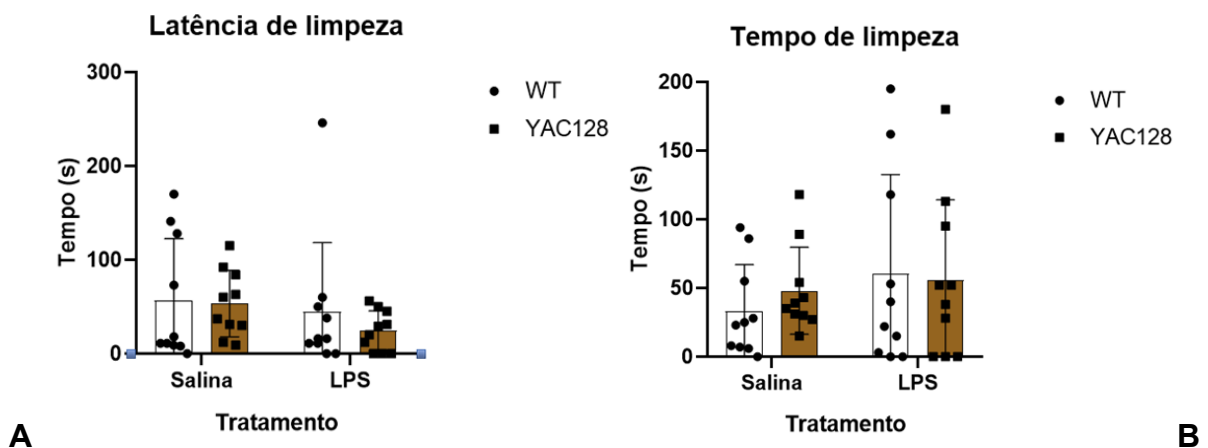
Resultado do teste do nado forçado, representando o tempo de imobilidade que os animais apresentaram. * $p < 0,05$, referente a diferença significativa dependente de tratamento; # $p < 0,05$, referente a diferença significativa dependente de genótipo.

Para avaliar o comportamento do tipo-depressivo dos animais utilizamos o teste de nado forçado. Como resultado da ANOVA de duas vias encontramos um aumento do tempo de imobilidade nos animais que receberam LPS [$F(1, 33) = 6,079$; $P = 0,0190$] (Figura 14), foi vista diferença dependente de genótipo [$F(1, 33) = 4,834$; $P = 0,0350$], porém não foi vista diferença na interação [$F(1, 33) = 0,4648$; $P = 0,5002$].

5.4 AVALIAÇÃO DA ANEDONIA DOS ANIMAIS

Para avaliar o comportamento anedônico dos animais utilizamos do teste de de borrifagem de sacarose, e como resultado para a latência de limpeza não encontramos diferença significativa entre os grupos, ou seja, independente do genótipo [F (1, 36) = 0,5073; P=0,4809], do tratamento [F (1, 36) = 1,476; P=0,2324] ou interação entre os grupos [F (1, 36) = 0.2495; P=0.6205], os animais não variaram muito a latência de tempo até iniciar a limpeza (Figura 15, a).

Figura 15 – Resultados do TBS



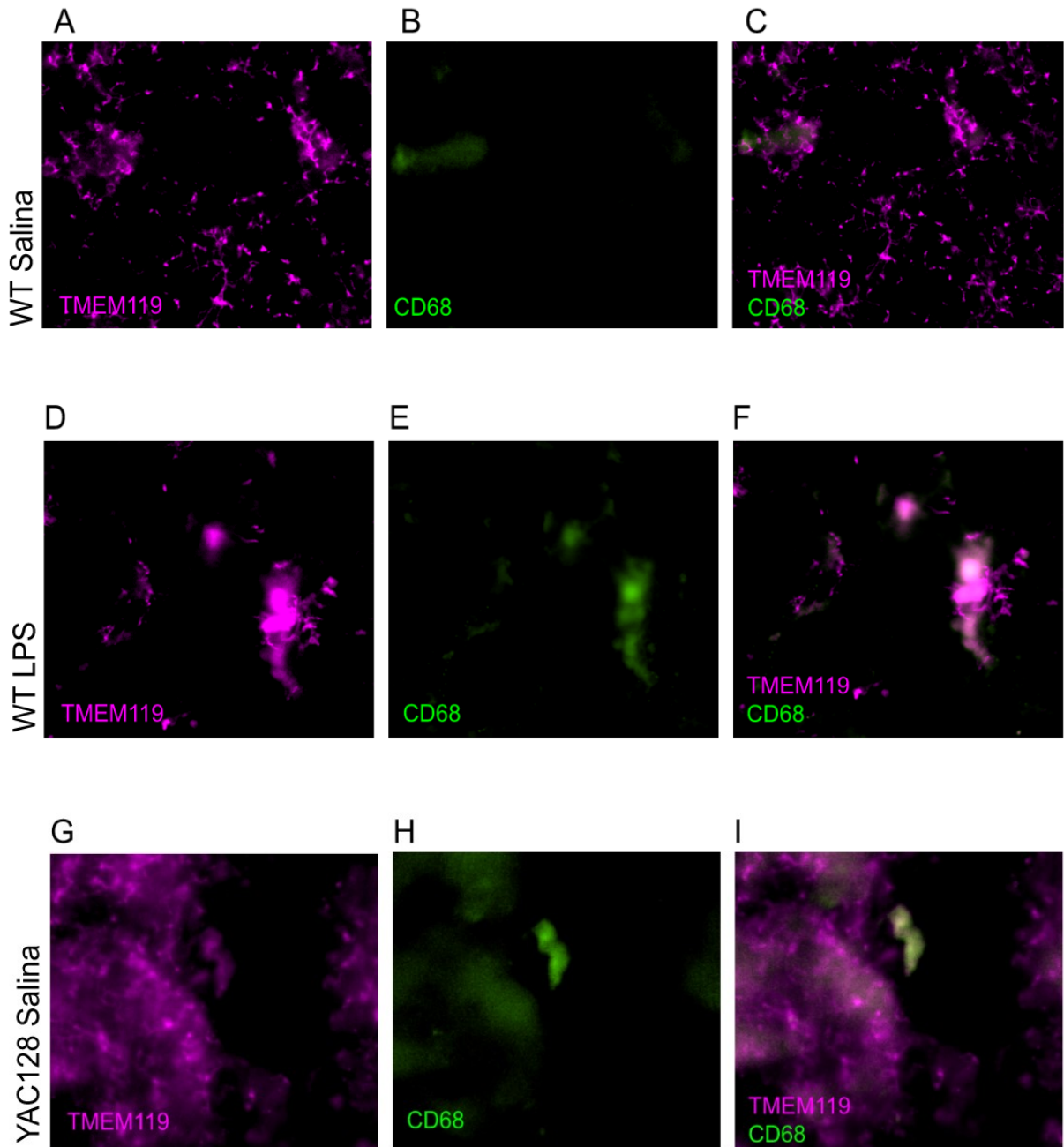
Resultados do *Splash test*, (a) avaliando a latência de limpeza dos animais, (b) e também o tempo que eles passavam se limpando. Não foi vista nenhuma diferença significativa. N = 10. Os dados são apresentados como média \pm E.P.M.

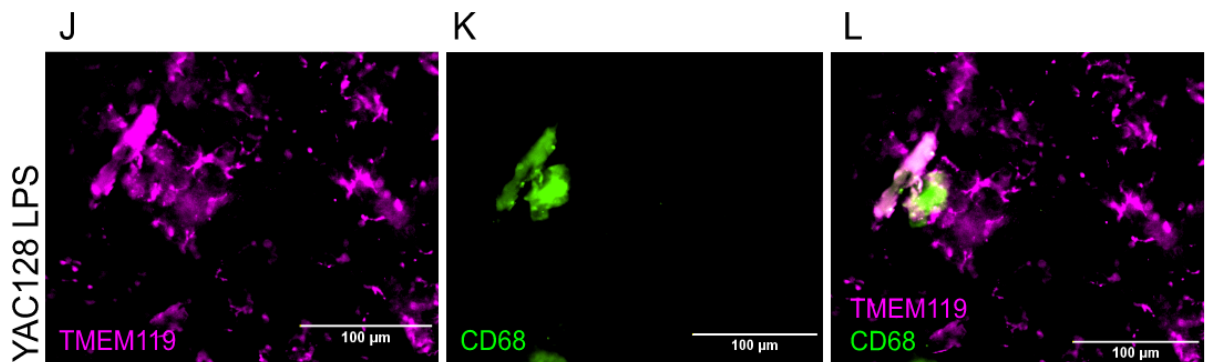
Após analisar a latência de limpeza, contabilizamos o tempo de limpeza dos animais, e também não encontramos diferença significativa entre os grupos, independente de tratamento [$F(1, 36) = 1,163$; $P=0,2880$], genótipo [$F(1, 36) = 0,09150$; $P=0,7640$] e interação [$F(1, 36) = 0,3697$; $P=0,5470$] (Figura 15, b).

5.5 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA MICROGLIAL

Para avaliar se poderíamos encontrar alguma diferença nas células microgliais entre os grupos, utilizamos da análise de imunofluorescência de fatias encefálicas. Utilizamos de dois marcados, o TMEM119 e o CD68, ambos marcadores de membrana celular. O TMEM119 pode ser utilizado para marcar todas as células microgliais presentes no tecido, enquanto o CD68 é marcador de macrófago ativado, dessa forma, podemos observar a microglia em seu estado mais ativado. No presente trabalho, utilizamos os dois marcadores em conjunto, podendo ser possível observar co-marcação entre eles (Figura 16), nos permitindo avaliar se as condições de genótipo e/ou inflamação induzida poderiam alterar o estado ou número desse tipo celular.

Figura 16 - Imunofluorescência para marcadores microgliais TMEM119 e CD68

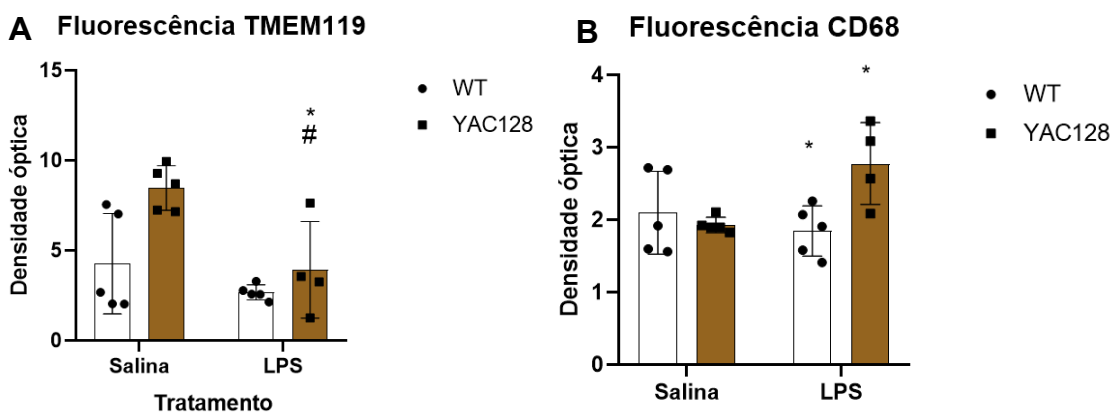




Imunofluorescência microglial do hipocampo de animais WT e YAC128. (a) TMEM119 (rosa), (b) CD68 (verde), (c) combinação dos canais rosa e verde no hipocampo do WT S (d, e, f), imagens do hipocampo do WT LPS (g, h, i), do YAC128 S (j, k, l) e do YAC128 LPS. N = 2. Escala: 100µm.

5.6 QUANTIFICAÇÃO DA IMUNOFLUORESCÊNCIA DE MARCADORES MICROGLIAIS

Figura 17 - Fluorescência de TMEM119 e CD68 no hipocampo



Análise estatística da fluorescência para TMEM119 (a) e CD68 (b) no hipocampo dos animais. * $p < 0,05$ referente a diferenças relacionada ao tratamento; # $p < 0,05$, referente a diferenças relacionadas ao genótipo dos animais. Os dados são apresentados como média \pm E.P.M.

Avaliando a fluorescência para os marcadores TMEM119 e CD68, foi possível observar uma diferença de tratamento [$F(1, 15) = 11.21$; $P:0.0183$], e também de genótipo [$F(1, 15) = 8.842$; $P: 0.0208$] na imunofluorescência para TMEM119, mas não na interação [$F(1, 15) = 2.585$; $P=0.1287$] (Figura 17, a). Na análise de CD68 também foi encontrada diferença significativa na fluorescência dependente de tratamento [$F(1, 15) = 2.242$; WT $P: 0.0267$; YAC128 $P: 0.0459$], e de interação [$F(1, 15) = 7.636$; $P=0.0145$], mas não de genótipo [$F(1, 15) = 3.651$; $P=0.0753$] (Figura 17, b).

6. DISCUSSÃO

Na DH a transmissão da doença é feita de forma hereditária (ROOS et al., 2010), e, dessa forma, o diagnóstico pode ser feito de maneira simples quando se sabe de histórico na família, ou com a presença dos sintomas motores característicos (WALKER, 2007). Os sintomas motores da DH podem aparecer de forma precoce (SEMANKA et al., 2006), entretanto sua forma mais comum é entre 35 e 50 anos de idade (*HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP*, 1993). Apesar da coreia ser o sintoma mais conhecido da DH, os primeiros sintomas que podem surgir são os cognitivos e psiquiátricos, como irritação e depressão (DU; PANG; HANNAN, 2013; VAN DUJIN et al., 2014). Nos modelos animais podemos encontrar paralelos entre o desenvolvimento desses sintomas nos humanos, entretanto as janelas temporais do início desses sintomas, motores, psiquiátricos ou cognitivos, variam. Dessa forma, nesse estudo propôs-se a utilização do camundongo YAC128, modelo da DH, porque ele apresenta uma janela maior até o início dos sintomas motores, quando comparado a outros modelos como o R6/1. Essa característica nos deu liberdade para estudar aspectos inflamatórios anteriores aos déficits motores que o modelo apresenta.

O LPS é comumente utilizado para desencadear respostas inflamatórias em modelos animais, onde os animais podem ter seu comportamento avaliado, durante e após o estágio de *sickness behavior*, e também as características celulares. Assim, no presente trabalho, utilizamos do LPS como modelo pela disponibilidade do mesmo

no laboratório e também da disponibilidade de informações na literatura para ajudar a fundamentar nossos achados.

A perda de peso é uma característica vista tanto em estágios mais avançados da DH, quanto em estágios mais iniciais (DJOUSSÉ et al., 2002), também é sabido que alguns modelos animais, como R6/2, são animais que tendem a perder peso com a progressão da doença (SJÖGREN et al., 2019), enquanto que os YAC128, são animais que tendem a ganhar peso com o passar do tempo (POULADI et al., 2010). No entanto, como utilizamos somente de uma idade dos animais, não é possível que façamos um paralelo com essa característica da doença. Com base nos nossos resultados, o LPS afetou de maneira similar os animais selvagens e os YAC128, apresentando uma redução de peso significativa 24h após a injeção.

Avaliando os sintomas psiquiátricos que nosso modelo poderia vir a apresentar, para verificar o comportamento do tipo-ansioso utilizamos do teste do campo aberto, onde podemos relacionar um comportamento menos ansioso aos animais que permanecem mais tempo no centro do aparato (BAILEY; CRAWLEY, 2009). Como primeiro resultado obtivemos que o LPS interfere reduzindo o número de entrada dos animais, independente do genótipo, no centro. Entretanto, quando avaliamos o tempo de permanência no centro, encontramos diferenças de genótipo entre os animais que receberam LPS e também diferença de tratamento, mostrando que os camundongos YAC128 que receberam LPS permaneceram menos tempo no centro do aparato. Dessa forma vemos que os camundongos YAC128 respondem ao estímulo inflamatório de maneira que seu comportamento reflete um comportamento mais do

tipo-ansioso, no parâmetro de tempo no centro, quando comparado ao animal selvagem.

Semelhante ao visto no número de entradas no centro, encontramos diferença no número de entradas na periferia, mas somente uma diferença de tratamento, ou seja, os animais que receberam LPS apresentaram uma menor taxa de entrada na periferia. Contudo, não foi vista uma diferença no tempo de permanência na periferia entre os grupos, o que nos leva a pensar que talvez os animais tenham uma diferença somente no número de entrada, e que permaneçam parados ou caminhando na área por mais tempo.

E avaliando a distância percorrida vemos que o LPS diminuiu essa distância nos YAC128 e nos animais selvagens. Como visto em Clark et al., (2015), 24h após a indução da inflamação já não é visto mais o *sickness behavior*, dessa forma, podemos atrelar a redução na distância percorrida pelos animais ao efeito da inflamação na atividade locomotora. Como visto por Pérez-Domínguez et al., (2019) o LPS pode diminuir a atividade locomotora nos animais, entretanto esse resultado foi visto pelo grupo somente 2h após a injeção de LPS (1mg/kg), as 24h o decaimento não se mantinha, o que diverge do nosso achado. De certo modo, nossos resultados mostram que, mesmo com o término do período de tempo do *sickness behavior* os efeitos da neuroinflamação gerada persistem e são visíveis na locomoção dos animais.

Assim, baseado no teste do campo aberto, podemos concluir que o LPS induziu um comportamento do tipo ansioso nos animais, independente do genótipo, mas os

animais YAC128 que receberam LPS apresentaram um menor tempo de permanência no centro, indicando assim um comportamento mais ansioso que os demais grupos, ou uma maior susceptibilidade a inflamação induzida por LPS.

Quanto à locomoção dos animais, verificada pela distância percorrida, foi vista uma redução dependente de tratamento, mas não de genótipo. O que esperávamos, tendo em vista que aos 3 meses de idade os YAC128 apenas apresentam déficits motores quando desafiados por algum aparato, como por exemplo o rotarod (POULADI et al., 2009), o que não é o caso do campo aberto.

O teste do nado forçado pode ser utilizado tanto em camundongos quanto em ratos (ANDREATINI; BACELLAR, 1999), e geralmente é utilizado para avaliação do comportamento do tipo-depressivo do animal, conforme proposto por Porsolt et al. (1977). Em nossos resultados encontramos diferença depende de tratamento, ou seja, os animais que receberam LPS passaram mais tempo imóveis durante o teste do que os animais que receberam salina. Como visto na literatura que o aumento do tempo de imobilidade está relacionado com o comportamento do tipo-depressivo em camundongos (KUDRYAVTSEVA; BAKSHTANOVSKAYA; KORYAKINA, 1991), e encontramos em nossos resultados um aumento desse tempo de imobilidade dependente de genótipo, os animais que possuem a mHtt apresentavam o comportamento do tipo-depressivo, mesmo que sem estímulo inflamatório do LPS. O que corrobora os achados de Pouladi et al. (2009), onde os YAC128 aos 3 meses de idade já apresentam o comportamento do tipo-depressivo quando comparados a animais selvagens. Visto também por nosso grupo onde os animais YAC128

apresentam um maior tempo de imobilidade quando comparados ao grupo controle no teste do nado forçado na mesma idade (FONSÊCA et al., 2018).

Para avaliar a anedonia, definida pelo psicólogo francês Ribot como uma incapacidade de sentir prazer, característica bastante presente na depressão (HUSAIN; ROISER, 2018), utilizamos do teste de borrifagem de sacarose, avaliando a latência de limpeza e também o tempo total de limpeza. Não encontramos diferença de genótipo ou de tratamento entre os grupos, indicando que a presença ou não da mutação não gerou anedonia nos animais. E que a presença ou não do LPS também não teve efeito nesse parâmetro. O que difere de Fonsêca et al, (2018), onde foi vista redução do tempo de limpeza entre animais que possuíam a mHtt e os que não possuíam.

Em nossas análises histológicas utilizamos o CD68, marcador de membrana celular de macrófagos e células microgliais em seu estado ativado, e o TMEM119, também marcador de membrana celular, mas somente de células microgliais (PAOLICELLI et al., 2022; KATSCHKE et al., 2001). Curiosamente, apesar da inflamação gerada por LPS, nossos resultados para a fluorescência de TMEM119 demonstram uma redução da densidade óptica das amostras que dependente de tratamento, mas também uma diferença dependente de genótipo, de forma que os animais YAC128 que receberam salina apresentaram uma maior densidade óptica quando comparados aos animais selvagens que receberam salina, ou seja, mesmo sem estímulo inflamatório externo, no caso o LPS, os animais que possuem a mHtt apresentam uma maior fluorescência para o marcador de microglia. O que já era

esperado, tendo em vista que trabalhos como Sapp et al., (2001), já relatavam o aumento de marcadores de ativação microglial no córtex pré-frontal de pacientes, assim como já foi vista um aumento significativo de Iba1, marcador de macrófagos, no cérebro de animais R6/2 quando comparados a animais selvagens (PALDINO et al., 2020). Os primeiros trabalhos utilizando o TMEM119 surgem entorno do ano de 2016 (BENNETT et al., 2016), assim, nosso trabalho surge como uma importante atualização na literatura sobre neuroinflamação na DH agregando dados com a especificidade de marcadores que antes não eram utilizados.

Para os dados relacionados à fluorescência do CD68 encontramos que apenas os camundongos YAC128 tratados com LPS apresentaram um aumento dessa fluorescência, indicando um estado mais ativo das células microgliais no hipocampo desses animais. Enquanto Giampa et al., (2013), apesar de utilizar de outro modelo animal para a DH, o R6/2, mostra que o animal que possui a mHtt e que recebeu somente a solução veículo possui diferença significativa de fluorescência para CD68 quando comparado ao animal controle, tal como Palazuelos et al., (2009), porém ambos somente no estriado. Dessa forma, nosso trabalho traz consigo dados que acrescentam ao campo da neuroinflamação na DH, avaliando como região células do hipocampo.

Apesar de ser visto um crescimento nos últimos anos, o estudo da neuroinflamação ainda não abrange a DH da mesma maneira que abrange estudos relacionados a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson. Deste modo, esse trabalho vem como um acréscimo no entendimento de como a neuroinflamação se

relaciona com a doença, e também como se relaciona com o hipocampo, região que já é vista dentro de estudos de transtornos que podem surgir na DH. Como dito por Paolicelli et al., (2022), a microglia apresenta diversos estados morfológicos, e diferentes morfologias dependentes das regiões do cérebro onde se encontram, então existem diversas variáveis que podem agir nos nossos resultados, podendo ser contornadas com ajustes metodológicos no futuro.

Em resumo, utilizando do protocolo de uma inflamação aguda gerada por LPS no nos animais dependente de genótipo e de tratamento, temos:

Tabela 2 - Resumo dos resultados obtidos

Parâmetro	WT S	WT LPS	YAC128 S	YAC128 LPS
Peso	-	↓	-	↓
Nº de entradas no centro	-	↓	-	↓
Nº de entradas na periferia	-	↓	-	↓
Tempo no centro	-	↓	-	↓ diminuiu mais que o WT LPS, sendo vista diferença de genótipo
Tempo na periferia	-	-	-	-
Distância percorrida	-	-	-	↓ diminuiu mais que o WT LPS, sendo

				vista diferença de genótipo
Tempo de imobilidade	-	↑	-	↑
Tempo de limpeza	-	-	-	-
Latência de limpeza	-	-	-	-
Fluorescência TMEM119	-	↓	↑ quando comparado ao WT S, sendo vista diferença de genótipo	↓
Fluorescência CD68	-	↑	-	↑

Resumo dos resultados obtidos no presente trabalho. Setas para cima representam aumento do parâmetro analisado, setas para baixo representam a diminuição desse parâmetro, hifens representam a não alteração no parâmetro. É descrito no quadro da tabela quando é vista diferença de genótipo.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir do material analisado temos resultados que podem contribuir melhor para o avanço do que sabemos entre neuroinflamação e a DH, a níveis comportamentais e também morfológicos. Dessa forma, como perspectivas futuras temos a de aumentar o N de amostras para análises morfológicas, nos dando mais segurança entre as diferenças que podem ser apresentadas entre os grupos.

Apesar de não termos avaliado a diferença entre os sexos, alguns trabalhos já trazem possíveis alterações microgliais entre machos e fêmeas, o que por consequência pode trazer alterações no comportamento dos animais baseado na diferença de sexo. Assim, aumentar o N de animais para que se possa fazer uma comparação entre os sexos nos daria mais material para enxergar as possíveis variáveis envolvidas na relação entre a DH e a neuroinflamação.

Também propomos a análise bioquímica do material coletado para avaliação dos níveis de citocinas, inflamassoma NLRP3 e níveis de BDNF no hipocampo e estriado dos animais, e também análise das citocinas do sangue dos animais de todos os grupos.

Assim, temos como perspectiva utilizar esse trabalho e outros que possam vir depois dele para melhorar o entendimento da DH e a neuroinflamação no nosso modelo, e também como esses aspectos conversam no decorrer da doença. Nosso trabalho tem potencial de contribuir sobre o que se sabe sobre os efeitos da mHtt no

desenvolvimento de sintomas psiquiátricos, como depressão e ansiedade, relacionado a uma possível neuroinflamação no histórico do paciente.

8. REFERÊNCIAS

ABIEGA, O. et al. Neuronal Hyperactivity Disturbs ATP Microgradients, Impairs Microglial Motility, and Reduces Phagocytic Receptor Expression Triggering Apoptosis/Microglial Phagocytosis Uncoupling. **PLoS Biology**, v. 14, n. 5, p. 1–48, 2016.

Al, L. W. et al. Minocycline inhibits LPS-induced retinal microglia activation. **Neurochemistry International**, v. 47, n. 1- 2 SPEC. ISS., p. 152–158, 2005.

AL-GHARAIBEH, A. et al. Induced pluripotent stem cell-derived neural stem cell transplantations reduced behavioral deficits and ameliorated neuropathological changes in YAC128 mouse model of Huntington's disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, n. NOV, p. 1–13, 2017.

ALTMAN, J.; DAS, G. D. Autoradiographic and Histological Evidence of Postnatal Hippocampal Neurogenesis in Rats'. **Journal of Comparative Neurology**, v. 124, p. 319–336, 1965.

AN, J. et al. Neuroprotective effects of natural compounds on LPS-induced inflammatory responses in microglia. **American Journal of Translational Research**, v. 12, n. 6, p. 2353–2378, 2020.

ANDRÉ, V. M.; CEPEDA, C.; LEVINE, M. S. Dopamine and glutamate in huntington's disease: A balancing act. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 16, n. 3, p. 163–178, 2010.

ANDREATINI, R.; BACELLAR, L. F. S. The relationship between anxiety and depression in animal models: A study using the forced swimming test and elevated plus-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 9, p. 1121–1126, 1999.

AUBERT, A.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Differential effect of lipopolysaccharide on food hoarding behavior and food consumption in rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 11, n. 3, p. 229–238, 1997.

BAKELS, H. S. et al. Juvenile-Onset Huntington Disease Pathophysiology and Neurodevelopment: A Review. **Movement Disorders**, v. 37, n. 1, p. 16–24, 2022.

BANKS, W. A.; ROBINSON, S. M. Minimal penetration of lipopolysaccharide across the murine blood-brain barrier. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 1, p. 102–109, 2010.

BAQUET, Z. C.; GORSKI, J. A.; JONES, K. R. Early Striatal Dendrite Deficits followed by Neuron Loss with Advanced Age in the Absence of Anterograde Cortical Brain-Derived Neurotrophic Factor. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 17, p. 4250–4258, 2004.

BATES, G. P. et al. Huntington disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. April, p. 1–21, 2015.

BEGETI, F. et al. Hippocampal dysfunction defines disease onset in Huntington's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 87, n. 9, p. 975–

981, 2016.

BENNETT, M. L. et al. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 12, p. E1738–E1746, 22 mar. 2016.

BJÖRKQVIST, M. et al. A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 8, p. 1869–1877, 2008.

BONAGUIDI, M. A. et al. In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. **Cell**, v. 145, n. 7, p. 1142–1155, 2011.

BRADY, R. V. Rare Disease Clinical Research Untapped potential in MENA A White Paper by Clinart MENA in collaboration with LongTaal Access live data. n. March, p. 1–17, 2019.

BRAMHAM, C. R.; MESSAOUDI, E. BDNF function in adult synaptic plasticity: The synaptic consolidation hypothesis. **Progress in Neurobiology**, v. 76, n. 2, p. 99–125, 2005.

BRENNAN, W. A.; BIRD, E. D.; APRILLE, J. R. Regional Mitochondrial Respiratory Activity in Huntington's Disease Brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 44, n. 6, p. 1948–1950, 1985.

BRINKMAN, R. R. et al. The likelihood of being affected with huntington disease by a particular age, for a specific CAG size. **American Journal of Human Genetics**, v. 60, n. 5, p. 1202–1210, 1997.

BROWNE, S. E.; FERRANTE, R. J.; BEAL, M. F. Oxidative stress in Huntington's disease. **Brain Pathology**, v. 9, n. 1, p. 147–163, 1999.

CAN, A. et al. The mouse forced swim test. **Journal of Visualized Experiments**, n. 58, p. 4–8, 2012.

CARTER, R. J.; MORTON, J.; DUNNETT, S. B. Motor Coordination and Balance in Rodents. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 15, n. 1, p. 8.12.1-8.12.14, 2001.

CATTANEO, E.; ZUCCATO, C.; TARTARI, M. Normal huntingtin function: An alternative approach to Huntington's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 12, p. 919–930, 2005.

CEPEDA, C. et al. Developmental origins of cortical hyperexcitability in Huntington's disease: Review and new observations. **Journal of Neuroscience Research**, v. 97, n. 12, p. 1624–1635, 2019.

CHANG, B. et al. Retinal degeneration mutants in the mouse. **Vision Research**, v. 42, n. 4, p. 517–525, 2002.

CHANG, K. H. et al. Plasma inflammatory biomarkers for Huntington's disease patients and mouse model. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 44, p. 121–127, 2015.

CHENG, M. L. et al. Metabolic disturbances in plasma as biomarkers for Huntington's disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 31, p. 38–44, 2016.

CHOI, Y. S. et al. CREB is a key regulator of striatal vulnerability in chemical and genetic models of Huntington's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 36, n. 2, p. 259–268, 2009.

CLARK, S. M. et al. Dissociation between sickness behavior and emotionality during lipopolysaccharide challenge in lymphocyte deficient Rag2^{-/-} mice. **Behav Brain**, v. 278, p. 74–82, 2015.

COLLE, D. et al. Probucol Increases Striatal Glutathione Peroxidase Activity and Protects against 3-Nitropropionic Acid-Induced Pro-Oxidative Damage in Rats. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1–15, 2013.

CROSSMAN, A. R. 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.

CUNNINGHAM, C. L.; MARTINEZ-CERDENO, V.; NOCTOR, S. C. Microglia Regulate the Number of Neural Precursor Cells in the Developing Cerebral Cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 10, p. 4216–4233, 2013.

DA FONSÊCA, V. S. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Prevents Depressive-Like Behaviors in Early-Symptomatic YAC128 Huntington's Disease Mice. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 9, p. 7201–7215, 2018.

DALE, M. et al. Disease stage, but not sex, predicts depression and psychological distress in Huntington's disease: A European population study. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 80, p. 17–22, 2016.

DALE, M. et al. Disease stage, but not sex, predicts depression and psychological distress in Huntington's disease: A European population study. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 80, p. 17–22, 2016.

DAVIES, S. W. et al. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. **Cell**, v. 90, n. 3, p. 537–548, 1997.

DE LA MONTE, S. M.; VONSATTEL, J. P.; RICHARDSON, E. P. Morphometric demonstration of atrophic changes in the cerebral cortex, white matter, and neostriatum in huntington's disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 47, n. 5, p. 516–525, 1988.

DE PAULA NASCIMENTO-CASTRO, C. et al. Antidepressant Effects of Probucol on Early-Symptomatic YAC128 Transgenic Mice for Huntington's Disease. **Neural Plasticity**, v. 2018, 2018.

DE SOUZA JC. The psychiatric phenotype in Huntington's disease. PhD thesis, University of Birmingham, UK, 2015.

DEAN, M.; SUNG, V. W. Review of deutetrabenazine: A novel treatment for chorea associated with Huntington's disease. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 313–319, 2018.

DENNY, C. A. et al. Cerebellar lipid differences between R6/1 transgenic mice and humans with Huntington's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 115, n. 3, p. 748–758, 2010.

DENOTH-LIPPUNER, A.; JESSBERGER, S. Formation and integration of new neurons in the adult hippocampus. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 22, n. 4, p. 223–236, 2021.

DISATNIK, M. H. et al. Potential biomarkers to follow the progression and treatment response of huntington's disease. **Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 12, p. 2655–2669, 2016.

DJOUSSE, L. et al. Weight loss in early stage of Huntington's disease. **Neurology**, v. 59, n. 9, p. 1325–1330, 2002.

DU, X.; PANG, T. Y. C.; HANNAN, A. J. A tale of two maladies? Pathogenesis of depression with and without the Huntington's disease gene mutation. **Frontiers in Neurology**, v. 4 JUL, n. July, p. 1–13, 2013.

DUIJN E. VAN et al. Neuropsychiatric symptoms in a European Huntington's disease cohort (REGISTRY). **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 85, p. 1411–1418, 2014.

ERIKSSON, P. S. et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature Medicine**, v. 4, n. 11, p. 1313–1317, 1998.

ESTRADA SÁNCHEZ, A. M.; MEJÍA-TOIBER, J.; MASSIEU, L. Excitotoxic Neuronal Death and the Pathogenesis of Huntington's Disease. **Archives of Medical Research**, v. 39, n. 3, p. 265–276, 2008.

ESTRADA-SÁNCHEZ, A. M.; REBEC, G. V. Role of cerebral cortex in the neuropathology of Huntington's disease. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 7, n. JAN, p. 1–9, 2013.

EYO, U. B.; DAILEY, M. E. Microglia: Key elements in neural development, plasticity, and pathology. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 8, n. 3, p. 494–509, 2013.

FARRER, L. A. Suicide and Attempted Suicide in Huntington Disease : Implications for Preclinical Testing of Persons at Risk. v. 311, 1986.

FENG, S.; WEN, X.; LU, X. Nitropeptide profiling and identification illustrated by angiotensin ii. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2019, n. 148, p. 1–8, 2019.

FILIPPOV, V. et al. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 23, n. 3, p. 373–382, 2003.

FRANCIOSI, S. et al. Age-dependent neurovascular abnormalities and altered microglial morphology in the YAC128 mouse model of Huntington disease. **Neurobiology of Disease**, v. 45, n. 1, p. 438–449, 2012.

GAO, H. M. et al. Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: Relevance to Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 81, n. 6, p. 1285–1297, 2002.

GARCIA-MIRALLES, M. et al. Early pridopidine treatment improves behavioral and transcriptional deficits in YAC128 Huntington disease mice. **JCI Insight**, v. 2, n. 23, p. 1–18, 2017.

GIAMPÀ, C. et al. Systemic Delivery of Recombinant Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in the R6/2 Mouse Model of Huntington's Disease. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1–12, 2013.

GIL, J. M.; REGO, A. C. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. May, p. 2803–2820, 2008.

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

GIL-MOHAPPEL, J. et al. Hippocampal Neurogenesis Levels Predict WATERMAZE Search Strategies in the Aging Brain. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–19, 2013.

GODBOUT, J. P. et al. Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice after activation of the peripheral innate immune system. **The FASEB Journal**, v.

19, n. 10, p. 1329–1331, 2005.

GROSS, O. et al. The inflammasome: An integrated view. **Immunological Reviews**, v. 243, n. 1, p. 136–151, 2011.

GROUP, T. H. D. C. R. et al. A Novel Gene Containing a Trinucleotide That Is Expanded and Unstable on Huntington's Disease Chromosomes. **Cell Press**, v. 72, p. 971–983, 1993.

GUBERT, C.; RENOIR, T.; HANNAN, A. J. Why Woody got the blues: The neurobiology of depression in Huntington's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 142, n. May, p. 104958, 2020.

GUPTA, S. et al. Demethyleneberberine : A possible treatment for Huntington ' s disease. **Medical Hypotheses**, v. 153, n. June, 2021.

GURUNG, P.; LUKENS, J. R.; KANNEGANTI, T. D. Mitochondria: Diversity in the regulation of the NLRP3 inflammasome. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 3, p. 193–201, 2015.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. **Journal of Comparative Psychology**, v. 22, n. 3, p. 345–352, 1936.

HEINSEN, H. et al. Cortical and striatal neurone number in Huntington's disease. **Acta Neuropathologica**, v. 88, n. 4, p. 320–333, 1994.

HO, L. W. et al. The molecular biology of Huntington ' s disease. **Psychological Medicine**, v. 31, p. 3–14, 2001.

HUSAIN, M.; ROISER, J. P. Neuroscience of apathy and anhedonia: A transdiagnostic approach. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 8, p. 470–484, 2018.

ILLUZZI, J. et al. DNA breakage and induction of DNA damage response proteins precede the appearance of visible mutant huntingtin aggregates. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 3, p. 733–747, 2009.

ISINGRINI, E. et al. Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: A model of fluoxetine resistance in mice. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, 2010.

JOHNSON, S. A. et al. Beyond disgust: Impaired recognition of negative emotions prior to diagnosis in Huntington's disease. **Brain**, v. 130, n. 7, p. 1732–1744, 2007.

KACHIAN, Z. R. et al. Suicidal ideation and behavior in Huntington's disease: Systematic review and recommendations. **Journal of Affective Disorders**, v. 250, n. December 2018, p. 319–329, 2019.

KASTER, M. P. et al. Caffeine acts through neuronal adenosine A2A receptors to prevent mood and memory dysfunction triggered by chronic stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 25, p. 7833–7838, 2015.

KATSCHKE, K. J. et al. Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 44, n. 5, p. 1022–1032, 2001.

KAUFMANN, F. N. et al. NLRP3 inflammasome-driven pathways in depression: Clinical and preclinical findings. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 64, n. October, p. 367–383, 2017.

KEMP, J. M.; POWELL, T. P. The connexions of the striatum and globus pallidus: synthesis and speculation. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 262, n. 845, p. 441–457, 1971.

KILLORAN, A.; BIGLAN, K. M. Current therapeutic options for Huntington's disease: Good clinical practice versus evidence-based approaches? **Movement Disorders**, v. 29, n. 11, p. 1404–1413, 2014.

KUDRYAVTSEVA, N. N.; BAKSHTANOVSKAYA, I. V.; KORYAKINA, L. A. Social Model of Depression in Mice of C57BL/6J Strain. **Pharmacology Biochemist D, & Behavior**, v. 38, p. 315–320, 1991.

KUMAR, A.; RATAN, R. R. Oxidative Stress and Huntington's Disease: The Good, the Bad, and the Ugly. **Journal of Huntington's Disease**, v. 5, n. 3, p. 217–237, 2016.

KUZMICH, N. N. et al. TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis. **Vaccines**, v. 5, n. 4, p. 1–25, 2017.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Inflammasomes and Their Roles in Health and Disease. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 28, n. 1, p. 137–161, 2012.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. **Cell**, v. 157, n. 5, p. 1013–1022, 2014.

LASSELIN, J. et al. Comparison of bacterial lipopolysaccharide-induced sickness behavior in rodents and humans: Relevance for symptoms of anxiety and depression. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 115, n. April, p. 15–24, 2020.

LAWSON, L. J. et al. Heterogeneity in the distribution and morphology of Microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 151–170, 1990.

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

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

LINTHORST, A. C. E. et al. Effect of bacterial endotoxin and interleukin-1 β on hippocampal serotonergic neurotransmission, behavioral activity, and free corticosterone levels: An in vivo microdialysis study. **Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 4, p. 2920–2934, 1995.

LOPES, C. et al. IGF-1 intranasal administration rescues Huntington's disease phenotypes in YAC128 mice. **Molecular Neurobiology**, v. 49, n. 3, p. 1126–1142, 2014.

LU, Y.; XIAO, G.; LUO, W. Minocycline suppresses NLRP3 inflammasome activation in experimental ischemic stroke. **NeuroImmunoModulation**, v. 23, n. 4, p. 230–238, 2016.

LÜESSE, H. G. et al. Evaluation of R6/2 HD transgenic mice for therapeutic studies in Huntington's disease: Behavioral testing and impact of diabetes mellitus. **Behavioural Brain Research**, v. 126, n. 1–2, p. 185–195, 2001.

LYMAN, M. et al. Neuroinflammation: The role and consequences. **Neuroscience Research**, v. 79, n. 1, p. 1–12, 2014.

MA, M. et al. Effects of brilliant blue G on serum tumor necrosis factor- α levels and depression-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, v. 12, n. 1, p. 31–36, 2014.

MAIURI, T. et al. DNA Damage Repair in Huntington's Disease and Other Neurodegenerative Diseases. **Neurotherapeutics**, v. 16, n. 4, p. 948–956, 2019.

MANN, D. M. A.; OLIVER, R.; SNOWDEN, J. S. The topographic distribution of brain atrophy in Huntington's disease and progressive supranuclear palsy. **Acta Neuropathologica**, v. 85, n. 5, p. 553–559, 1993.

MANGIARINI, L. et al. Exon 1 of the HD Gene with an Expanded. **Cell Press**, v. 87, p. 493–506, 1996.

MANSOUR, H. et al. Consanguinity and increased risk for schizophrenia in Egypt Hader. **Schizophr Res.**, v. 120, p. 108–112, 2010.

MARSICANO, G. et al. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: Role of the cannabinoid receptor CB1. **Journal of Neurochemistry**, v. 80, n. 3, p. 448–456, 2002.

MCALLISTER, B. et al. Timing and Impact of Psychiatric, Cognitive, and Motor Abnormalities in Huntington Disease. **Neurology**, v. 96, n. 19, p. e2395–e2406, 2021.

MENALLED, L. Knock-In Mouse Models of Huntington's Disease. **The American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 2, n. 8, p. 465–470, 2008.

MIGUEZ, A. et al. Fingolimod (FTY720) enhances hippocampal synaptic plasticity and memory in Huntington's disease by preventing p75NTR up-regulation and astrocyte-mediated inflammation. **Human Molecular Genetics**, v. 24, n. 17, p. 4958–4970, 2015.

MO, C.; HANNAN, A. J.; RENOIR, T. Environmental factors as modulators of neurodegeneration: Insights from gene-environment interactions in Huntington's disease. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 52, p. 178–192, 2015.

MURROUGH, J. W.; ABDALLAH, C. G.; MATHEW, S. J. Targeting glutamate signalling in depression: Progress and prospects. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 7, p. 472–486, 2017.

NOCK, M. K. et al. Cross-national prevalence and risk factors for suicidal ideation, plans and attempts. **British Journal of Psychiatry**, v. 192, n. 2, p. 98–105, 2008.

NOVAK, M. J. U.; TABRIZI, S. J. Huntington's disease. **BMJ (Online)**, v. 340, n. 7762, p. 34–40, 2010.

OLTON, D. S.; BECKER, J. T.; HANDEIMANN, G. E. Hippocampus, space, and memory. **The Behavioral and Brain Sciences**, v. 2, p. 313–365, 1979.

O'REGAN, G. C. et al. Human Huntington's disease pluripotent stem cell-derived microglia develop normally but are abnormally hyper-reactive and release elevated levels of reactive oxygen species. **Journal of Neuroinflammation**, v. 18, n. 1, p. 1–17, 2021.

PALAZUELOS, J. et al. Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. **Brain**, v. 132, n. 11, p. 3152–3164, 2009.

PALDINO, E. et al. Pyroptotic cell death in the R6/2 mouse model of Huntington's disease: new insight on the inflammasome. **Cell Death Discovery**, v. 6, n. 1, 2020.

PALPAGAMA, T. H. et al. The Role of Microglia and Astrocytes in Huntington's Disease. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, n. October, p. 1–15, 2019.

PAULI, W. M. et al. Regional specialization within the human striatum for diverse psychological functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 7, p. 1907–1912, 2016.

PAOLI, R. A. et al. Neuropsychiatric burden in huntington's disease. **Brain Sciences**, v. 7, n. 6, p. 1–15, 2017.

PAOLICELLI, R. et al. Defining Microglial States and Nomenclature: A Roadmap to 2030. **SSRN Electronic Journal**, 2022.

PAPP, K. V. et al. Measuring executive dysfunction longitudinally and in relation to genetic burden, brain volumetrics, and depression in prodromal huntington disease. **Archives of Clinical Neuropsychology**, v. 28, n. 2, p. 156–168, 2013.

PAULSEN, J. S. et al. Neuropsychiatric aspects of Huntington's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 5, p. 310–314, 2001.

PAULSEN, J. S., HAYDEN, M. R., STOUT, J. C., LANGBEHN, D. R., AYLWARD, E. H., ROSS, C. A., et al. Preparing for preventive clinical trials: The predict-HD study. **Archives of Neurology**, v. 63, p.883–890, 2006.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. Paxinos and Franklin's The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 4th Edn. **Elsevier Academic Press**, San Diego, 2013.

PEREZ-DOMINGUEZ, M. et al. The detrimental effects of lipopolysaccharide-induced neuroinflammation on adult hippocampal neurogenesis depend on the duration of the

pro-inflammatory response. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 5, p. 817–825, 2019.

PFLANZ, S. et al. The clinical manifestation of mental disorder in Huntington's disease: a retrospective case record study of disease progression. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 83, n. 1, p. 53–60, 1991.

POLIDORI, M. C. et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA in Huntington's disease parietal cortex. **Neuroscience Letters**, v. 272, n. 1, p. 53–56, 1999.

PORSOLT RD, BERTIN A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 229, p. 327-336, 1977.

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

POULADI, M. A.; MORTON, A. J.; HAYDEN, M. R. Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 10, p. 708–721, 2013.

PRAAG, H. VAN et al. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. **Nature**, v. 415, p. 1030–1034, 2002.

QIN, L. et al. Structure and dynamics characteristic of training loads in direct initial preparation of swimmers. **Glia**, v. 55, p. 453–462, 2007.

RANSOME, M. I.; RENOIR, T.; HANNAN, A. J. Hippocampal neurogenesis, cognitive Deficits and affective disorder in Huntington's disease. **Neural Plasticity**, v. 2012, 2012.

RIBEIRO, F. M. et al. Metabotropic glutamate receptor-mediated cell signaling pathways are altered in a mouse model of Huntington's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 1, p. 316–324, 2010.

ROOS, R. A. Clinical Review Huntington ' s disease. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 341, p. 34–40, 2010.

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

ROSI, S. et al. Memantine protects against LPS-induced neuroinflammation, restores behaviorally-induced gene expression and spatial learning in the rat. **Neuroscience**, v. 142, n. 4, p. 1303–1315, 2006.

RUBIN, R. D. et al. The role of the hippocampus in flexible cognition and social behavior. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 8, n. SEP, p. 1–15, 2014.

RUOCCO, H. H. et al. Striatal and extrastriatal atrophy in Huntington's disease and its relationship with length of the CAG repeat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 8, p. 1129–1136, 2006.

SAGREDO, O. et al. Cannabinoids: Novel medicines for the treatment of Huntington's disease. **Recent Patents on CNS Drug Discovery**, v. 7, n. 1, p. 41–48, 2012.

SALTER, M. W.; STEVENS, B. Microglia emerge as central players in brain disease.

Nature Medicine, v. 23, n. 9, p. 1018–1027, 2017.

SAPP, E. S. et al. Early and Progressive Accumulation of Reactive Microglia in the Huntington Disease Brain. **Journal of Neuropathology and Experimental**

Neurology, v. 60, n. 02, 2001.

SARKAR, S.; RUBINSZTEIN, D. C. Huntington's disease: Degradation of mutant huntingtin by autophagy. **FEBS Journal**, v. 275, n. 17, p. 4263–4270, 2008.

SAY, M. J. et al. Visuomotor integration deficits precede clinical onset in Huntington's disease. **Neuropsychologia**, v. 49, n. 2, p. 264–270, 2011.

SCHMAAL, L. et al. Subcortical brain alterations in major depressive disorder : findings from the ENIGMA Major Depressive Disorder working group. **Molecular Psychiatry**, n. June 2015, p. 806–812, 2016.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821–832, 2010.

SEMAKA, A. et al. Predictive testing for Huntington disease : interpretation and significance of intermediate alleles. **Clinical Genetics**, p. 283–294, 2006.

SEPERS, M. D.; RAYMOND, L. A. Mechanisms of synaptic dysfunction and excitotoxicity in Huntington's disease. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 7, p. 990–996, 2014.

SHABAB, T. et al. Neuroinflammation pathways: a general review. **International Journal of Neuroscience**, v. 127, n. 7, p. 624–633, 2017.

SHAH, P. J. et al. Cortical grey matter reductions associated with treatment-resistant chronic unipolar depression: Controlled magnetic resonance imaging study. **British Journal of Psychiatry**, v. 172, n. JUNE, p. 527–332, 1998.

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

SINGHAL, G. et al. Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: A focused review. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, n. SEP, p. 1–22, 2014.

SILVESTRONI, A. et al. Distinct neuroinflammatory profile in post-mortem human Huntington's disease. **NeuroReport**, v. 20, n. 12, p. 1098–1103, 2009.

SJÖGREN, M. et al. Leptin deficiency reverses high metabolic state and weight loss without affecting central pathology in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 132, p. 104560, 2019.

SLOW, E. J. et al. Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington's disease. **Human Molecular Genetics**, v. 12, n. 13, p. 1555–1567, 2003.

SNOWDEN, J. S. et al. Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology Psychomotor , Executive , and Memory Function in Preclinical Huntington ' s Disease

Psychomotor , Executive , and Memory Function in Preclinical Huntington ' s Disease.

Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology, v. 24, p. 133–145, 2002.

SOFRONIEW, M. V. Astroglial perspectives. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 7, n. 2, p. 1–16, 2015.

STRATOULIAS, V. et al. Microglial subtypes: diversity within the microglial community.

The EMBO Journal, v. 38, n. 17, p. 1–18, 2019.

TAI, F. et al. Microglial activation in presymptomatic Huntington' s disease gene carriers. **Brain**, v. 130, p. 1759–1766, 2007.

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.

TERESHCHENKO, A. V. et al. Abnormal development of cerebellar-striatal circuitry in Huntington disease. **Neurology**, v. 94, n. 18, p. e1908–e1915, 2020.

THOMPSON, J. C. et al. Longitudinal evaluation of neuropsychiatric symptoms in Huntington' s disease. **Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 24, n. 1, p. 53–60, 2012.

TYAGI, E. et al. Cholinergic protection via $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors and PI3K-Akt pathway in LPS-induced neuroinflammation. **Neurochemistry International**, v. 56, n. 1, p. 135–142, 2010.

VALADÃO, P. A. C. et al. Inflammation in Huntington's disease: A few new twists on an old tale. **Journal of Neuroimmunology**, v. 348, n. August, 2020.

VALIONYTE, E. et al. Lowering Mutant Huntingtin Levels and Toxicity: Autophagy-Endolysosome Pathways in Huntington's Disease. **Journal of Molecular Biology**, v. 432, n. 8, p. 2673–2691, 2020.

VAN DER PLAS, E. et al. Abnormal brain development in child and adolescent carriers of mutant huntingtin. **Neurology**, v. 93, n. 10, p. E1021–E1030, 2019.

VONSATTEL, J. P. et al. Neuropathological classification of huntington's disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 44, n. 6, p. 559–577, 1985.

WAGSTER, M. V. et al. Selective loss of [3H]kainic acid and [3H]AMPA binding in layer VI of frontal cortex in Huntington's disease. **Experimental Neurology**, v. 127, p. 70–75, 1994.

WALKER, F. O. Huntington's disease. **Lancet**, v. 369, n. 9557, p. 218–228, 2007.

YOUNG, A. B. et al. NMDA receptor losses in putamen from patients with Huntington's disease. **Science**, v. 241, n. 4868, p. 981–983, 1988.

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. 155–163, 1995.

ZHENG, J. et al. A Mitochondria-Associated Oxidative Stress Perspective on Huntington's Disease. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, n. September, p. 1–10, 2018.

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

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