

Ana Cláudia Wink

**EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA  
MODULAÇÃO DO COMPORTAMENTO PRÉ-MOTOR NO  
MODELO ANIMAL YAC128 DA DOENÇA DE HUNTINGTON**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao  
Curso de Ciências Biológicas da Universidade  
Federal de Santa Catarina para obtenção do  
Título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia S. Brocardo  
Coorientadora: Msc. Cristine P. N. Castro

Florianópolis  
2017

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

Wink, Ana Cláudia

Efeitos do enriquecimento ambiental na modulação  
do comportamento pré-motor no modelo animal YAC128  
da doença de Huntington / Ana Cláudia Wink ;  
orientadora, Patricia de Souza Brocardo,  
coorientadora, Cristine de Paula Nascimento Castro,  
2017.

48 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de  
Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,  
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Doença de Huntington.  
3. Enriquecimento ambiental. 4. Camundongo YAC128.  
I. de Souza Brocardo, Patricia. II. de Paula  
Nascimento Castro, Cristine. III. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências  
Biológicas. IV. Título.

*Dedico este trabalho aos meus avós, José Fridolino Wink e Therezinha Wink que, se ainda vivos, ficariam orgulhosos de ver sua neta concluindo um sonho.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer à minha mãe, Áurea Wink, por confiar e dar total liberdade e apoio nas minhas escolhas em todos os momentos de minha vida. Sem o seu suporte, emocional e financeiro, eu não teria chego onde estou. Espero que, por ter chegado até aqui, tenha lhe proporcionado um tanto de orgulho.

Ao meu amado namorado, melhor amigo, parceiro, João Francisco Souza que, nos mais difíceis momentos soube me animar e incentivar quando preciso. Por todo apoio e amor (e paciência!), muito obrigada!

Aos amigos e amigas - aos de longe e aos de perto -, agradeço pela amizade, disposição, apoio, carinho e dedicação. Vocês fazem a diferença em minha vida.

Aos colegas de laboratório do LANEP: Victor, Claudia, Kátia e Evelini, por sempre estarem dispostos a debater uma ideia, pelas risadas, pelo todo compartilhado. Em especial, à Cristine (Tine!), por ser parceira de laboratório, amiga, confidente, coorientadora. Pelos ensinamentos de bancada e de vida, não tenho palavras para te agradecer por tudo! Aproveito para agradecer também às colegas do Laboratório de Neuroquímica: Ruth, Daiane, Gabriela, Letícia e Profa. Andreza, por sempre se mostrarem disponíveis.

Aos amigos - colegas e professores -, feitos ao longo destes 5 anos de Biologia e UFSC. Por todo convívio e aprendizados!

Deixo aqui também minha gratidão à toda família Wink, por ter contribuído na formação de meu caráter e personalidade, bem como meu agradecimento para todos os professores que um dia passaram pela minha vida.

Agradeço à UFSC pelo espaço físico disponibilizado, mesmo às vezes precariamente, para estudo e trabalho, e ao CNPq pela bolsa concedida para o desenvolvimento de meus trabalhos no Laboratório de Neuroplasticidade (LANEP). Também deixo meus agradecimentos e respeito aos animais utilizados neste trabalho.

Por último, não menos importante, deixo meus profundos agradecimentos à Profa. Patricia por ter me escolhido e acolhido em 2015, por todos os ensinamentos, por toda confiança depositada em mim. És uma profissional e pessoa excepcional e exemplar, e me sinto extremamente feliz por poder conviver com uma pessoa como você.

*“É impossível viver sem fracassar em algo, a não ser que você viva tão cautelosamente que é como se você nem estivesse vivendo – o que também é fracasso.”*

*(J. K. Rowling, 2008)*

## RESUMO

A doença de Huntington (DH) é uma doença genética neurodegenerativa caracterizada por alterações motoras progressivas, déficits cognitivos e distúrbios neuropsiquiátricos. O camundongo YAC128 é um modelo animal transgênico que expressa a mutação inteira do gene humano, desenvolvendo os sintomas característicos da DH, sendo um excelente modelo para testar potenciais terapias para o controle da DH. O enriquecimento ambiental (EA) é uma combinação de estímulos de objetos inanimados e estímulos sociais que podem influenciar aspectos morfofuncionais cerebrais quando comparado a uma condição padrão de habitação. Este trabalho teve como objetivo investigar se a exposição a um EA é capaz de modular o comportamento motor, tipo-depressivo e memória no modelo animal YAC128. Aos 60 dias de idade, camundongos YAC128 e selvagens (machos e fêmeas, n=10) foram divididos em dois grandes grupos: Enriquecimento Ambiental (EA) e Ambiente Controle (AC). Os animais do grupo EA foram alojados em caixas translúcidas de policarbonato (41x34x16cm) com diferentes objetos de diferentes formas, tamanhos, cores e texturas, além de terem acesso a uma roda de corrida voluntária. A maioria dos objetos e suas localizações foram renovadas duas vezes na semana. Os animais do grupo AC foram alojados em caixas com dimensões idênticas ao do grupo EA, no entanto, sem nenhum objeto. Ambos os grupos permaneceram em seus ambientes pelo período de 2 meses e foram mantidos em condições padrão de biotério. Os animais foram submetidos a testes comportamentais aos 4 meses de idade para avaliar o comportamento tipo-depressivo, atividade motora e memória de longo prazo. Os resultados foram analisados usando ANOVA de duas vias seguido do teste *post-hoc* de Duncan quando apropriado, ou teste *t* de Student, e considerados significativos quando  $p \leq 0,05$ . Foi observado comportamento tipo-depressivo e déficit motor nos camundongos YAC128 aos 4 meses de idade. O EA foi capaz de modular positivamente a anedonia nos animais selvagens, bem como diminuir o tempo de descida dos camundongos YAC128 no pole teste.

**Palavras-chave:** Doença de Huntington. Camundongo YAC128. Enriquecimento Ambiental.

## ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is a genetic neurodegenerative disease characterized by progressive motor alterations, cognitive deficits, and neuropsychiatric disorders. The YAC128 mouse is a transgenic animal model that expresses the entire mutation of the human gene, developing the characteristic symptoms of HD, being an excellent model to test potential therapies for HD control. Environmental enrichment (EE) is a combination of inanimate object stimuli and social stimuli, which may influence brain morphofunctional aspects when compared to a standard housing condition. The aim of this study was to investigate whether exposure to EE is able to modulate motor behavior, depressive-like behavior, and memory in the YAC128 HD mouse model. At 60 days of age, YAC128 and wild-type mice (male and female, n=10) were divided into two major groups: Environmental Enrichment (EE) and Control Environment (CE). In the EE group animals were housed in translucent polycarbonate boxes (41x34x16cm) with different objects of different shapes, sizes, colors, and textures, besides having access to a voluntary running wheel. Most of the objects and their locations were renewed twice a week. The animals of the CE group were housed in boxes of the same size as the EE group, however, with no object. Both groups remained in their environments for a period of 2 months and were kept on the standard animal facility. The animals were submitted to behavioral tests at 4 months of age to evaluate mood, motor activity, and long-term memory. Results were analyzed using two-way ANOVA followed by the Duncan post-hoc test when appropriate, or Student's t-test, and considered significant when  $p \leq 0.05$ . Depressive-like behavior and motor deficits was observed in YAC128 mice at 4 months of age.

**Keywords:** Huntington Disease. YAC128 mice. Environmental Enrichment.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
1.1 Doença de Huntington.....	9
<b>1.1.1 Sintomas pré-motores na Doença de Huntington</b> .....	<b>10</b>
1.2 Camundongos YAC128 .....	11
1.3 Enriquecimento Ambiental .....	12
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>16</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
3.1 Objetivo Geral.....	17
3.2 Objetivos Específicos.....	17
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
4.1 Animais.....	19
4.2 Genotipagem .....	19
4.3 Protocolo Experimental.....	20
4.4 Avaliação Comportamental.....	22
<b>4.4.1 Avaliação do comportamento anedônico e tipo-depressivo</b> .....	<b>23</b>
<b>4.4.2. Avaliação da atividade motora</b> .....	<b>23</b>
<b>4.4.3 Avaliação da memória de longo prazo</b> .....	<b>24</b>
4.5 Análises Estatísticas .....	25
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>35</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>38</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>39</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DOENÇA DE HUNTINGTON

A Doença de Huntington (DH) é uma doença genética neurodegenerativa caracterizada por alterações motoras progressivas, distúrbio emocional, demência e morte neuronal (GIL & REGO, 2008), sendo o transtorno neurológico monogênico mais comum em países desenvolvidos (EVANS et al., 2013; FISCHER & HAYDEN, 2014). Descrita pelo médico George Huntington em 1872, que identificou as características clínicas da doença e o padrão de transmissão familiar (HUNTINGTON, 1872), no entanto, foi somente em 1983 que a mutação gênica causadora da DH foi localizada no cromossomo 4 (GUSELLA et al., 1983) e, posteriormente, isolada pelo Huntington's Disease Collaborative Research Group, que identificou uma mutação na porção 5' do gene IT15 no braço curto do cromossomo 4, que codifica a proteína huntingtina (htt). Tal mutação ocasiona uma expansão da sequência de nucleotídeos citosina, adenina e guanina (CAG – que codifica o aminoácido glutamina), resultando em uma proteína mutante com uma sequência de poliglutaminas (poli-Q) no terminal amínico da proteína huntingtina (HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP, 1993). Esta expansão na cadeia proteica da huntingtina é anormal comparada à proteína funcional em pessoas sem a DH, apresentando propriedades tóxicas que causam disfunção e morte neuronal (BATES, 2015). Embora a proteína htt mutante seja expressa durante toda a vida e em todo o organismo, na maioria dos casos, o aparecimento dos principais sintomas surge apenas na idade adulta, entre os 35 e 50 anos de idade (ROOS, 2010) e a degeneração celular ocorre principalmente no cérebro, particularmente no estriado e em certas camadas do córtex cerebral. A doença progride ao longo do tempo, tornando-se fatal entre 15 a 20 anos após o aparecimento dos primeiros sintomas (ROSS & TABRIZI, 2011). Embora a DH seja uma doença progressiva, sua taxa de progressão varia de indivíduo para indivíduo, o que pode sugerir que fatores ambientais podem influenciar na progressão desta doença.

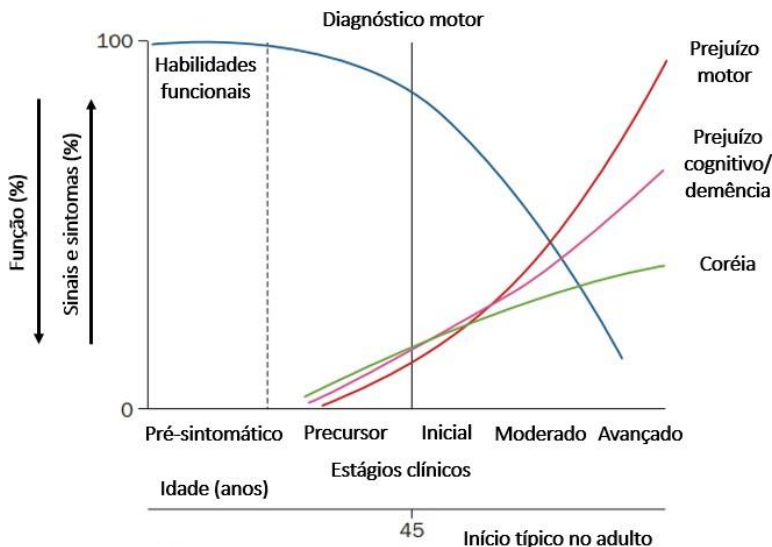
Estudos epidemiológicos demonstram que a incidência da DH é estimada em 4,7-6,9 casos novos por milhão/ano nas populações ocidentais (BATES, 2015), apesar de ser endêmica para todas as populações, ela ocorre em frequências muito mais altas entre indivíduos de ascendência europeia.

### 1.1.1 Sintomas pré-motores na Doença de Huntington

Clinicamente, a DH caracteriza-se por distúrbio motor coreico progressivo, declínio cognitivo e distúrbios psiquiátricos (ROOS, 2010). Os primeiros sinais da doença são sutis e podem variar bastante entre cada indivíduo. Em fases precoces, podem ser observadas alterações moderadas na execução dos movimentos, dificuldades na resolução de problemas, irritabilidade e depressão. As alterações motoras progredem de forma lenta, e os pacientes perdem gradualmente a capacidade dos movimentos da fala e deglutição em fases mais avançadas da doença (GARCIA RUIZ et al., 2000; ROOS, 2010). As manifestações psiquiátricas, como depressão e apatia, são muito frequentes e comuns, acometendo mais de 50% dos pacientes na fase inicial da doença, bem como a ansiedade e a irritabilidade, que são sintomas dos estágios iniciais da doença (MARTINEZ-HORTA et al., 2016). Na literatura é relatado o risco de suicídio aumentado nos estágios iniciais da doença e nos portadores assintomáticos (ORTH et al., 2011; FARRER, 1986). Segundo Farrer (1986), o suicídio na DH é quatro vezes mais frequente do que na população geral, e estima-se que ao longo do percurso da doença mais de 25% dos afetados apresentam comportamentos suicidas. Indivíduos com DH também apresentam déficits cognitivos, apresentando como principais sinais o declínio da capacidade lógica e de memória (ROOS, 2010), podendo ser detectados décadas antes do aparecimento dos sintomas motores, em alguns casos (**Figura 1**). Transtornos de humor como o estresse, ansiedade e depressão podem agravar o quadro da doença, diminuindo a capacidade funcional do indivíduo. Portanto, intervenções capazes de modular tais transtornos podem contribuir para o retardo da progressão da DH (PLA et al., 2014). Ainda, medidas quantificáveis das habilidades funcionais dos pacientes com DH, incluindo avaliações de caráter motor e cognição, mostram mudanças relacionadas à doença em estágios iniciais da doença (ROSS et al., 2014).

Logo, dada a alta prevalência de distúrbios neuropsiquiátricos, e o impacto dos mesmos nas atividades diárias dos indivíduos com DH, o estudo dos sintomas pré-motores da DH torna-se significativo para a identificação de potenciais intervenções terapêuticas para o controle da doença.

**Figura 1. Progressão dos sintomas clínicos na Doença de Huntington.**



**Figura 1.** Adaptada de Ross et al., 2014.

## 1.2 CAMUNDONGOS YAC128

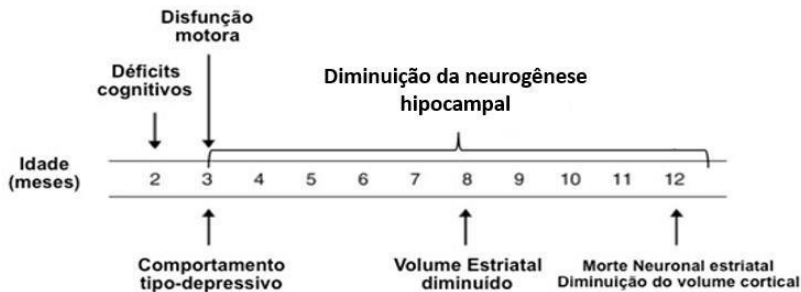
Atualmente, existem diversos modelos animais transgênicos disponíveis para o estudo da DH (EHRNHOEFER et al., 2009; HICKEY & CHESSELET, 2003). Os camundongos YAC128 expressam o gene inteiro humano da DH com 128 repetições de CAG e apresentam uma degeneração seletiva dos neurônios estriatais com uma deterioração motora progressiva e uma sobrevida longa (SLOW et al., 2003). Sendo assim, essa linhagem é considerada a mais representativa da condição humana (VAN RAAMSDONK et al., 2007).

Os camundongos YAC128 exibem comprometimento motor bifásico com um período inicial de hiperatividade seguido por uma fase hipoativa, semelhante ao que é observado em indivíduos portadores da DH (VAN RAAMSDONK et al., 2007). O aparecimento dos déficits motores está correlacionado com a perda dos neurônios estriatais nos camundongos YAC128 (SLOW et al., 2003).

Estudos têm indicado que os camundongos transgênicos YAC128 desenvolvem déficits cognitivos moderados, que precedem o aparecimento das anormalidades motoras e estes precedem com a idade

(VAN RAAMSDONK et al., 2005), bem como também apresentam comportamento tipo-depressivo nos estágios iniciais da DH (POULADI et al., 2009) (**Figura 2**).

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



**Figura 2.** Os camundongos YAC128 apresentam déficits cognitivos aos 2 meses de idade e disfunção motora e comportamento tipo-depressivo aos 3 meses de idade, seguido por neuropatologia seletiva no estriado aos 8 meses e diminuição do volume cortical aos 12 meses de idade. Vale ressaltar que os YAC128 apresentam também diminuição da proliferação celular hipocampal a partir dos 3 meses de idade (Adaptada de Pouladi et al., 2009).

As similaridades entre o fenótipo dos camundongos YAC128 com a condição humana faz deste modelo transgênico uma excelente ferramenta para estudar os mecanismos implicados na fisiopatologia dessa doença, e para testar potenciais estratégias terapêuticas que possam modificar o curso da progressão da DH (GIL-MOHAPEL, 2011).

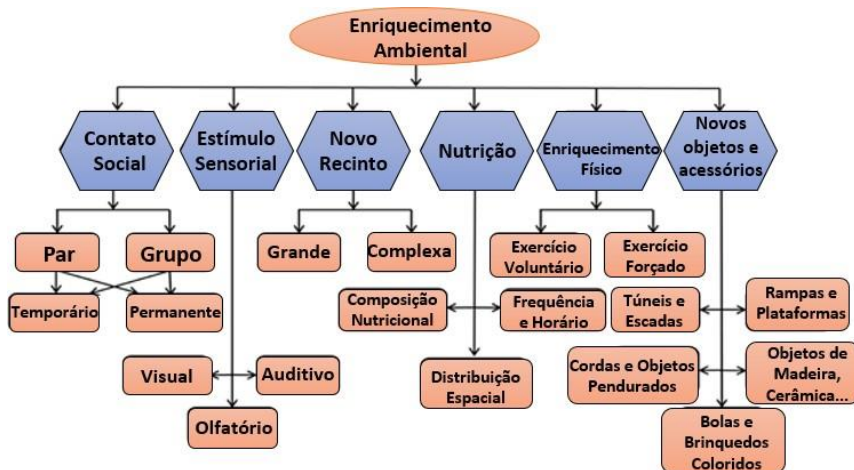
### 1.3 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL

Enriquecimento ambiental (EA), ou ambiente enriquecido, é definido como “uma combinação de estímulos complexos de objetos inanimados e sociais que influenciam aspectos morfofuncionais cerebrais por aumentar a estimulação sensorial, cognitiva, motora e de interação social” (GELFO et al., 2011) quando comparado com a condição padrão de habitação.

Muitos estudos com roedores demonstram os benefícios do EA para a estimulação de diferentes regiões do encéfalo, influenciando a neuroquímica e neuroanatomia, refletindo no aumento das atividades

sensoriais-motoras, interações sociais, performances cognitivas e estimulação da plasticidade cerebral (ROSENZWEIG et al., 1966). Em roedores, o EA pode ser proporcionado de diferentes maneiras (**Figura 3**).

**Figura 3.** Métodos de enriquecimento ambiental para roedores em cativeiro.



**Figura 3.** Enriquecimento ambiental para roedores em cativeiro pode ser obtido fornecendo contato social (par, grupo, permanente, temporário); atividade física utilizando rodinhas de corrida; recintos novos, maiores e mais complexos; objetos e acessórios novos; estímulo sensorial (visual, auditivo e olfatório); e uma melhor nutrição (Adaptada de Singhal et al., 2014).

A literatura demonstra que terapias semelhantes ao EA podem ser aplicadas em humanos. Embora executadas de formas distintas, a condição de EA é capaz de promover estimulação mental, melhorando a capacidade de resposta aos novos desafios e funções psicossociais (SINGHAL et al., 2014).

Na ausência de tratamentos eficazes para doenças neurodegenerativas, o aumento da estimulação ambiental pode ser considerado como uma estratégia potencial para a melhora dos sintomas e o retardo da progressão destas doenças. Diferentes estudos demonstram que um estilo de vida ativo com envolvimento social elevado é capaz de proteger contra a demência e a doença de Alzheimer

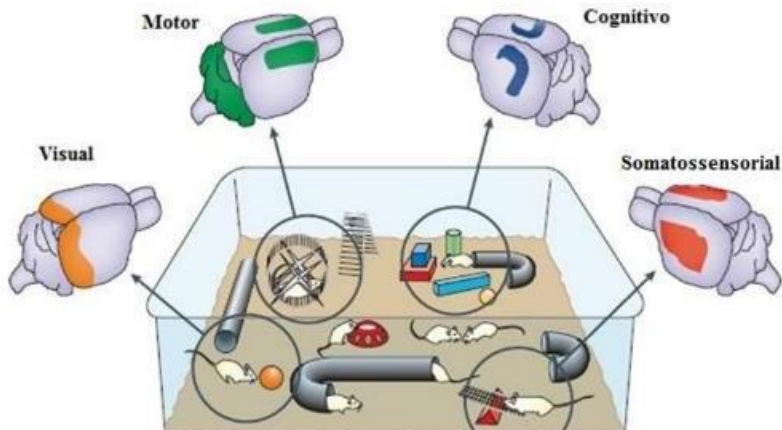
em humanos (FRATIGLIONI et al., 2004; BAKER et al., 2010; LEE et al., 2010). Efeitos benéficos semelhantes da estimulação física, social e cognitiva podem ser observados em indivíduos com DH (SULLIVAN et al., 2001; ZINZI et al., 2007).

Sabe-se que o EA é capaz de prevenir o declínio cognitivo relacionado com o envelhecimento (FRERET et al., 2012), e amenizar a ocorrência deste declínio nos modelos de doenças neurodegenerativas em roedores (VAN PRAAG et al., 2000; NITHIANANTHARAJAH & HANNAN, 2006). Mesmo quando aplicado em roedores adultos saudáveis, o EA, de uma forma geral, promove uma melhora na execução da memória espacial (KEMPERMANN et al., 1998; HUANG et al., 2007) e memória não espacial (RAMPON et al., 2000; TANG et al., 2001; BRUEL-JUNGERMANN et al., 2005). Em roedores, o EA também possui efeito ansiolítico (BENAROYA-MILSHTEIN et al., 2004; GALANI et al., 2007) e antidepressivo (HATTORI et al., 2007; LLORENS-MARTÍN et al., 2007; XU et al., 2009; JHA et al., 2011).

Estudos demonstram que o EA também pode ser capaz de retardar o aparecimento dos sintomas motores e déficits cognitivos iniciais em modelos animais da DH (VAN DELLEN et al., 2000; SPIRES et al., 2004; PANG et al., 2006; NITHIANANTHARAJAH et al., 2008).

O EA pode promover ativação neuronal, alterações na sinalização celular e plasticidade em várias regiões do encéfalo. O aumento da estimulação sensorial e visual ativa os córtices somatossensorial e visual, respectivamente. O aumento da estimulação cognitiva, como por exemplo, a codificação de informações relativas ao espaço, reconhecimento de objetos, novidade e modulação da atenção é capaz de ativar o hipocampo. Além disso, o reforço da atividade motora e exploratória estimula áreas como o córtex motor e cerebelo (NITHIANANTHARAJAH & HANNAN, 2006) (**Figura 4**).

**Figura 4. Enriquecimento ambiental e os efeitos da estimulação sensorial, motora e cognitiva em diferentes áreas do encéfalo.**



**Figura 4.** Adaptada de Nithianantharajah e Hannan, 2006.

Algumas alterações neurobiológicas que podem estar relacionadas com a exposição ao EA têm sido estudadas. Estudos com roedores alojados em condições de EA demonstram que há um aumento no peso e na espessura cortical (DIAMOND et al., 1964; BENNETT et al., 1969), bem como no volume hipocampal (KEMPERMANN et al., 1997). A exposição ao EA aumenta a plasticidade cerebral por meio da regulação de diferentes fatores de crescimento, como o aumento do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF, do inglês Brain-derived neurotrophic factor) (ICKES et al., 2000), uma neurotrofina muito importante em diversos processos no sistema nervoso, e aumento da concentração de neurotransmissores, como serotonina e noradrenalina hipocampal (GALANI et al., 2007; BRENES et al., 2009).

## 2 JUSTIFICATIVA

A DH é uma doença genética neurodegenerativa de caráter progressivo que não possui cura e, até o momento, não possui um tratamento efetivo para o controle de sua progressão. Devido à falta de um tratamento satisfatório e de um bom prognóstico, possíveis portadores da mutação para DH não se entusiasmam em serem geneticamente testados. No entanto, o tempo ideal para a introdução de estratégias terapêuticas capazes de modificar o curso desta doença é antes do aparecimento do sintoma característico da doença, a coréia, quando significativa neurodegeneração já é observada. Os camundongos YAC128 são uma excelente ferramenta para investigar o potencial de estratégias terapêuticas que possam modificar o curso desta doença pois reproduzem o fenótipo que um indivíduo com DH apresenta ao longo da vida. Desta forma, o estudo dos efeitos de uma intervenção não farmacológica como o EA torna-se relevante, já que é de conhecimento que esta condição ambiental pode ser capaz de atuar no melhoramento das características neurobiológicas relacionadas aos sintomas pré- motores da DH.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi investigar se a exposição a um EA é capaz de atenuar o aparecimento dos sintomas pré-motores presentes na DH.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar se a exposição a uma condição de EA é capaz de:

- 1) Retardar o aparecimento e o desenvolvimento do comportamento tipo-depressivo em camundongos YAC128;
- 2) Modular o comportamento anedônico em camundongos YAC128;
- 3) Retardar o aparecimento e o desenvolvimento dos déficits motores em camundongos YAC128;
- 4) Modular a memória de longo prazo em camundongos YAC128.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

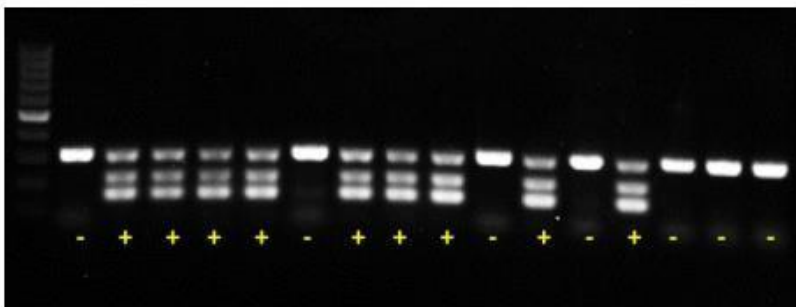
Os camundongos transgênicos YAC128 e selvagens foram doados pelo Dr. Brian R. Christie da University of Victoria, Canadá. A colônia destes animais está mantida em gaiolas opacas de plástico (30 x 20 x 13 cm) com 5 animais/caixa no biotério setorial do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, Brasil), em estantes ventiladas e climatizadas a 21-23°C, com livre acesso a água e comida, sob um ciclo claro-escuro de 12:12h (07:00-19:00h). Camundongos YAC128 (linhagem FVB/N) e selvagens de ambos os sexos, com idade de 2 meses no início do experimento, foram utilizados neste trabalho. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o Instituto Nacional de Guia de Saúde para o Cuidado e Uso de Animal de Laboratório e foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Catarina (Protocolo CEUA: PP00944). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento animal e reduzir o número de animais utilizados nesses experimentos.

### 4.2 GENOTIPAGEM

O processo de genotipagem foi utilizado para identificar os animais que apresentam a mutação da DH. Para o procedimento de genotipagem foi utilizado o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, EUA). Amostras de tecido da orelha dos camundongos foram coletadas e incubadas em solução de lise (250 µL de solução de lise nuclear, 50 µL de EDTA, 2 µL de proteinase K (20 mg/mL) e 2 µL de solução de RNase) por 3 horas a 55°C. Após a digestão, foram adicionados 100 µL de solução de precipitação proteica. Os tubos foram agitados, mantidos no gelo por aproximadamente 5 minutos e centrifugados a 14000g durante 4 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um eppendorf contendo 300 µL de álcool isopropanol. As amostras foram novamente centrifugadas a 14000g durante 1 minuto e, posteriormente, o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 300 µL de etanol 70% e, em seguida, os tubos foram centrifugados a 14000g por um minuto. O etanol foi descartado e, após a secagem completa do tubo, o DNA foi reidratado com 50 µL de água livre de nuclease.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada por meio da adição de mix contendo 5  $\mu$ L de Master Mix e 0,5  $\mu$ L de cada par de primer. Por último, foram adicionados 2  $\mu$ L de cada amostra de DNA (volume final: 10  $\mu$ L). Os primers utilizados para a identificação do genótipo foram: LYA1= 5' CCTGCTCGCTTCGCTACTTGGAGC3'; LYA2= 5' GTCTTGCGCCTTAAACCAACTTGG3'; RYA1= 5' CTTGAGATCGGGCGTTCGACTCGC3'; RYA2= 5' CCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGC3'. Para controle positivo foram utilizados: Actina R= 5' AGCCTCAGGGCATCGGAACC3', Actina F= 5' GGAGACGGGGTACCCACAC3'. O produto da amplificação foi adicionado em gel de agarose 1,5% com 10,000X Syber e visualizado em fotodocumentador CHEMIDOC (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA).

**Figura 5. Exemplo do gel da genotipagem dos camundongos YAC128.**



**Figura 5.** Os símbolos (+) indicam animais positivos para a mutação (YAC128) e o (-) indicam animais negativos para a mutação (selvagens). Fonte: a autora.

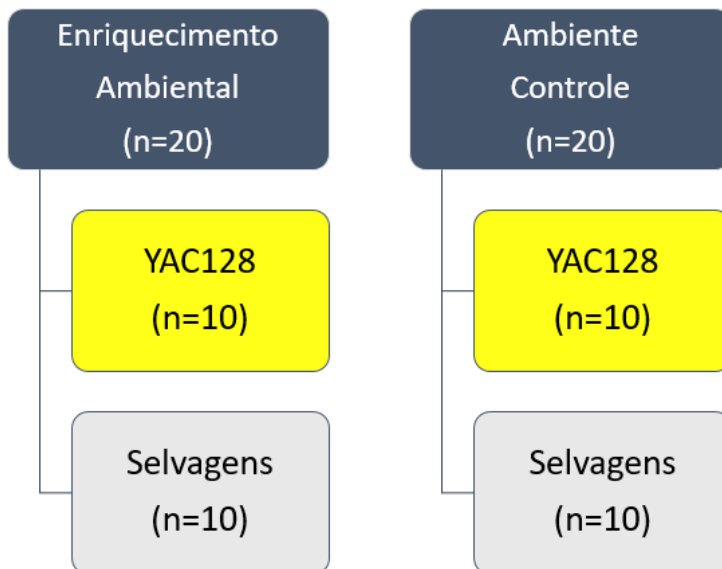
#### 4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Aos 60 dias de idade, os animais foram divididos em dois grandes grupos (**Figura 6**):

I) Enriquecimento Ambiental (EA): camundongos YAC128 e selvagens (n=20), foram mantidos em caixas translúcidas de policarbonato (41 x 34 x 16 cm), com diferentes objetos de diferentes formas, tamanhos, cores e texturas, além de terem acesso a uma roda de corrida voluntária. A maioria dos objetos e suas localizações foram renovadas duas vezes na semana para garantir novidade (BOUET et al., 2011);

II) Ambiente Controle (AC): camundongos YAC128 e selvagens (n=20), foram mantidos em caixas translúcidas de policarbonato (41 x 34 x 16 cm), sem qualquer objeto.

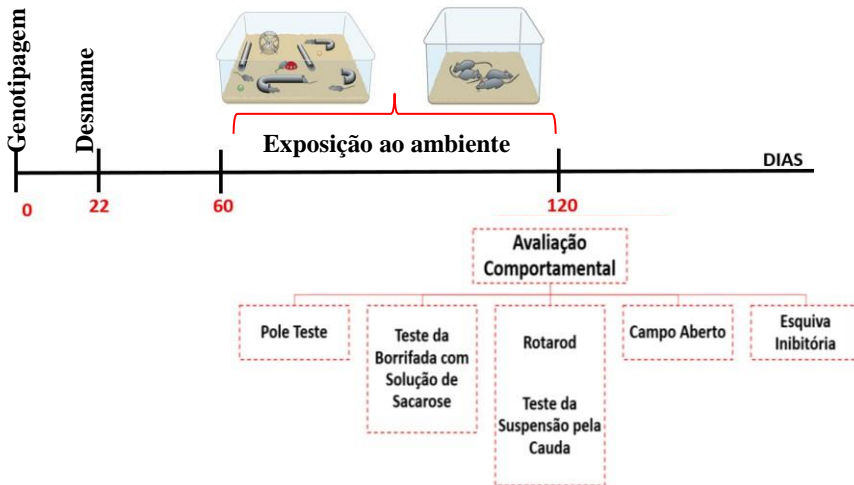
**Figura 6. Representação esquemática dos grupos experimentais.**



**Figura 6.** Ao completarem 60 dias de idade, os animais foram divididos em 4 grupos: camundongos Selvagens EA e AC e camundongos YAC128 EA e AC (n=10 para cada grupo experimental).

Os animais foram expostos por 60 dias consecutivos aos respectivos ambientes (**Figura 7**). Durante a limpeza das caixas, alguns objetos não foram mudados e nem limpos, bem como a cada limpeza uma parte do material de nidificação da caixa anterior foi colocada na caixa limpa a fim de limitar comportamentos interindividuais aversivos (VAN LOO et al., 2003).

**Figura 7. Protocolo experimental.**



**Figura 7.** Os animais foram genotipados com 22 dias de idade (desmame) e, a partir dos 60 dias de idade, foram expostos aos respectivos ambientes até completarem 120 dias de vida. Os animais foram submetidos a avaliação comportamental após este período.

Baseado no fenótipo dos camundongos YAC128 descrito por Pouladi et al., (2009) (**Figura 2**), a avaliação da progressão da DH foi realizada aos 4 meses (120 dias) de idade dos animais, por meio da avaliação comportamental.

#### 4.4 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Ao completar 4 meses de idade, e após 2 meses de permanência nos respectivos ambientes (EA ou AC), os animais foram avaliados por meio de uma bateria de testes comportamentais. Todos os testes foram realizados no período entre 09:00h e 16:00h, e os animais foram ambientados previamente à sala de comportamento por pelo menos 1 hora. Os testes de Campo Aberto e Teste da Suspensão pela Cauda foram filmados e analisados por meio do software AnyMaze (Stoelting, Wood Dale, IL U.S.A). Os demais foram analisados no momento do teste. Os testes foram realizados de acordo com a seguinte ordem:

Dia 1 – Pole teste (treino); Teste da Borrifada com solução de Sacarose;

- Dia 2 – Pole teste (teste); Barra giratória (Rotarod);  
Dia 3 – Campo Aberto; Teste da Suspensão pela Cauda;  
Dia 4 – Esquiva inibitória (treino);  
Dia 5 – Esquiva inibitória (teste).

#### 4.4.1 Avaliação do comportamento anedônico e tipo-depressivo

Para avaliar o comportamento tipo-depressivo foram utilizados:

a) *Teste da Borrifada com solução de Sacarose (TBS)* – o comportamento de anedonia foi avaliado por meio do teste previamente descrito por Isingrini et al., (2010) com pequenas modificações. O teste consiste em borrifar uma solução de sacarose 10% sob o dorso do animal. Devido à sua viscosidade, a solução de sacarose suja o pelo do animal e ele inicia o comportamento de autolimpeza, indicando um sinal de autocuidado. Além disso, pela solução ser palatável, o tempo que o animal passa se limpando pode ser interpretado como uma mensuração de anedonia. A latência para iniciar o comportamento de autolimpeza e o tempo total de limpeza no período de 5 minutos foram registrados.

b) *Teste da Suspensão pela Cauda (TSC)* – a duração total de imobilidade induzida pelo TSC foi avaliada de acordo com o método descrito por Steru et al., (1985). Os animais foram suspensos 50 cm acima do chão com fita adesiva colocada a aproximadamente 1 cm da ponta da cauda. Os animais foram considerados imóveis apenas quando estiveram pendurados passivamente e completamente imóveis. O tempo de imobilidade dos animais foi registrado durante 6 minutos. O comportamento tipo-depressivo tem sido descrito como uma rendição do animal em situações de “desespero comportamental” a qual é induzido, isto é, o animal perde a esperança de escapar do ambiente estressante o qual ele é exposto (PORSOLT et al., 1977).

#### 4.4.2 Avaliação da atividade motora

Para avaliar a atividade motora dos animais foram utilizados:

a) *Pole Teste* – o protocolo utilizado foi conforme Matsuura et al., (1997) com algumas modificações. Os animais foram colocados de cabeça para cima no topo de uma vareta vertical de madeira com superfície áspera (55 cm altura x 1 cm diâmetro). Cada animal foi habituado ao equipamento um dia antes do teste, e foram permitidas 5 descidas-treino, permitindo um tempo máximo de 2 minutos por descida. O tempo total entre o animal virar de cabeça para baixo até atingir o chão com suas quatro patas foi registrado. Para cada sessão de

cinco testes, o melhor desempenho foi utilizado. Se o animal não foi capaz de virar completamente para baixo, caiu ou escorregou, o valor padrão de 2 minutos foi registrado.

b) *Barra Giratória (Rotarod)* – a atividade locomotora foi avaliada utilizando o teste do rotarod como previamente descrito (LOPES et al., 2014), validado como teste de avaliação de coordenação motora por Carter et al., (2001). O aparato é composto por uma barra giratória de 30 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro, a qual possui 4 compartimentos individualizados (Insight®, São Paulo, Brasil). Os animais foram previamente ambientados ao aparato por 2 minutos, a uma velocidade constante de 5 rpm, para permitir a familiarização com o equipamento. Após 2 horas de intervalo, cada animal foi testado em quatro sessões, com uma aceleração gradual de 5-37 rpm durante 5 minutos, sendo que um intervalo de 60 minutos entre cada sessão foi mantido. Foram registrados o tempo de latência para a primeira queda e o número de quedas, e os resultados foram expressos pela média de tempo das 4 sessões.

c) *Campo Aberto (CA)* – a atividade locomotora exploratória foi avaliada de acordo com o teste previamente descrito por Walsh e Cummin (1976). O equipamento utilizado consistiu em uma caixa de madeira de medidas 40 x 60 x 50 cm de dimensão. O chão da arena foi dividido em 2 regiões: central e periferia. A distância percorrida e o tempo gasto no centro e na periferia foram avaliados em uma sessão de 6 minutos, utilizando o software AnyMaze. O CA foi limpo com solução de etanol 10% entre os testes a fim de eliminar vestígios de outros animais.

#### **4.4.3 Avaliação da memória de longo prazo**

O teste da esquiwa inibitória tem sido bastante utilizado como teste de retenção de memória desde sua criação. Este teste é eficiente e possui rápida execução, sendo necessária apenas uma sessão de treino por animal (JARVIK & ESSMAN, 1960). Levando em conta que os camundongos YAC128 possuem lesão retinal, um teste que não demande pistas visuais para avaliar a condição cognitiva dos animais é o mais recomendável. Os animais foram submetidos a treino prévio individual, sendo colocados sob uma plataforma dentro de uma caixa fechada, com a porção inferior da caixa consistindo em uma grade de metal passível de corrente elétrica onde o animal, ao descer da plataforma com as quatro patas, recebeu um choque de baixa intensidade (0,5mA por 10 segundos), retornando à sua gaiola moradia posteriormente a sessão.



Para avaliar a retenção da memória de longa duração, os animais foram submetidos a uma sessão de teste 24 horas após o treino (CAMMAROTA et al., 2003). Na sessão de teste, o animal foi exposto à mesma situação do treino, exceto que, ao descer da plataforma, o animal não recebeu o choque. Foi mensurada a latência de descida da plataforma para a grade. Para ambas as sessões foi adotado como tempo máximo de descida da plataforma 5 minutos. Aqueles animais que durante a sessão de treino não desceram da plataforma antes de transcorridos 300 segundos, foram excluídos do estudo.

#### 4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 7 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA). Os dados obtidos dos testes comportamentais foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de duas vias para verificar as diferenças entre genótipo (YAC128 x selvagem) e ambiente (enriquecido x controle), seguido pelo teste *post-hoc* de Duncan quando apropriado. O teste *t* de Student foi realizado quando houve diferença estatística entre os genótipos ou tratamentos, mas não houve interação, a fim de localizar estas diferenças. Os valores foram expressos como média + E.P.M., e os resultados foram considerados significativos quando  $p \leq 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

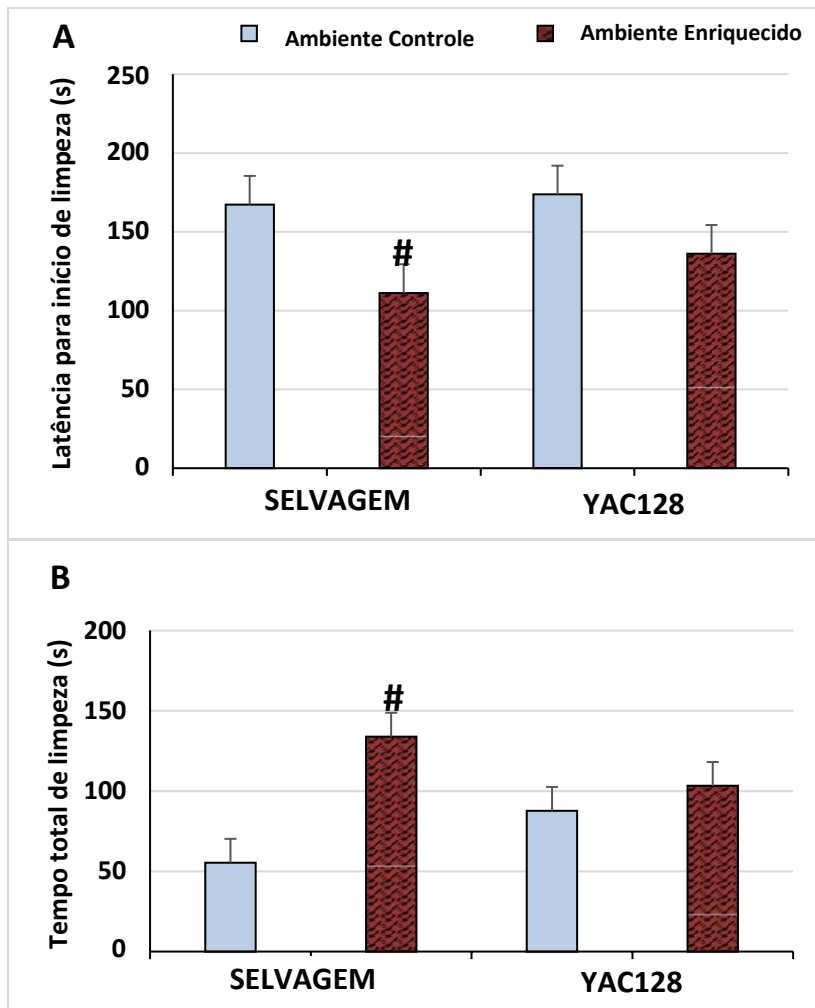
Não houveram diferenças estatísticas entre fêmeas e machos, dentro de cada genótipo, quando analisados os dados dos testes. Desta forma, os resultados apresentados, dentro de cada grupo, possuem representantes de ambos os sexos.

### 5.1 EFEITOS DO AMBIENTE NO COMPORTAMENTO ANEDÔNICO E TIPO-DEPRESSIVO EM CAMUNDONGOS SELVAGENS E YAC128

A análise realizada a partir do TBS possibilitou verificar o tempo de latência para início da autolimpeza durante o período de 5 minutos. Por meio da ANOVA de duas vias não observamos um efeito do genótipo [ $F(1, 36) = 0,74, p = 0,39$ ] ou da interação entre ambiente x genótipo [ $F(1, 36) = 0,74, p = 0,39$ ]. No entanto, observamos um efeito significativo do ambiente [ $F(1, 36) = 6,64, p < 0,05$ ]. O teste *t* de Student, revelou um efeito significativo do EA nos animais selvagens ( $p < 0,05$ ), diminuindo o tempo de latência para início da autolimpeza quando comparado ao tempo dos animais selvagens do AC (**Figura 8A**).

De acordo com o que foi observado no tempo de latência para início da autolimpeza, a ANOVA de duas vias mostrou uma interação entre ambiente e genótipo no tempo total de limpeza dos animais [ $F(1, 36) = 4,47, p < 0,05$ ]. O teste de *post-hoc* de Duncan revelou que os camundongos selvagens em condição de EA aumentaram o tempo total de limpeza ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos animais selvagens do AC (**Figura 8B**).

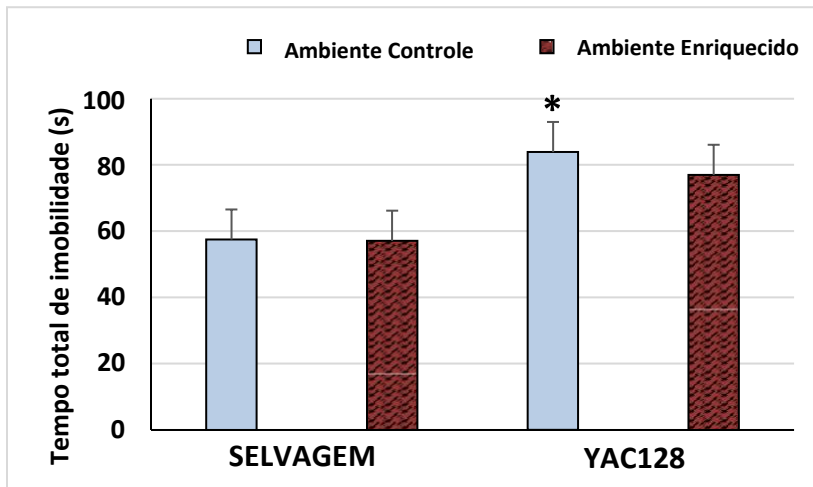
**Figura 8.** Tempo de latência para início de limpeza e autolimpeza no TBS em camundongos selvagens e YAC128 expostos ao EA e AC.



**Figura 8.** Os valores indicam a média do tempo total de latência para início da autolimpeza em camundongos selvagens e YAC128 aos 4 meses de idade (painel A). Os valores indicam a média do tempo total de autolimpeza de camundongos selvagens e YAC128 aos 4 meses de idade (painel B). Os resultados foram expressos como média + E.P.M.  $n=10$  por grupo. #  $p < 0,05$  quando comparado com os animais selvagens do AC.

No TSC foi avaliado o tempo de imobilidade dos animais no período de 6 minutos. A ANOVA de duas vias mostrou não haver efeito do ambiente [ $F(1, 36) = 0,16, p = 0,69$ ], nem interação entre ambiente x genótipo [ $F(1, 36) = 0,12, p = 0,72$ ]. No entanto um efeito do genótipo [ $F(1, 36) = 6,47, p < 0,05$ ] foi observado. A comparação dos genótipos utilizando o teste t mostrou que os animais transgênicos YAC128 do AC apresentaram comportamento tipo-depressivo aos 4 meses, demonstrado pelo aumento do tempo de imobilidade ( $p < 0,05$ ) quando comparados com os animais selvagens do AC (**Figura 9**).

**Figura 9.** Tempo total de imobilidade no TSC em camundongos selvagens e YAC128 expostos ao EA e AC.



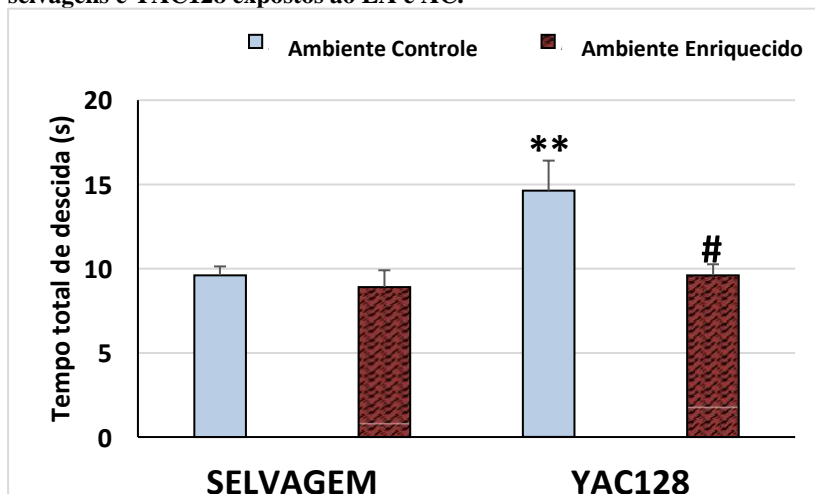
**Figura 9.** Os valores indicam a média do tempo total de imobilidade de camundongos selvagens e YAC128 aos 4 meses de idade. Os resultados foram expressos como média + E.P.M.  $n=10$  por grupo. \*  $p < 0,05$  quando comparados com os animais selvagens expostos ao AC.

## 5.2 EFEITOS DO AMBIENTE NO COMPORTAMENTO MOTOR DE CAMUNDONGOS SELVAGENS E YAC128

A avaliação do comportamento motor foi acessada por meio de três testes. No Pole teste, a ANOVA de duas vias demonstrou efeito do genótipo [ $F(1, 34) = 7,95, p < 0,01$ ], do ambiente [ $F(1, 34) = 7,95, p < 0,01$ ], e interação entre ambiente x genótipo [ $F(1, 34) = 4,54, p < 0,05$ ], onde os camundongos YAC128 em condição de EA diminuem o tempo para descida quando comparado ao tempo dos animais transgênicos no AC; e

o aumento do tempo para descida dos camundongos YAC128 quando comparado ao tempo dos animais selvagens, ambos em condição de AC (Figura 10).

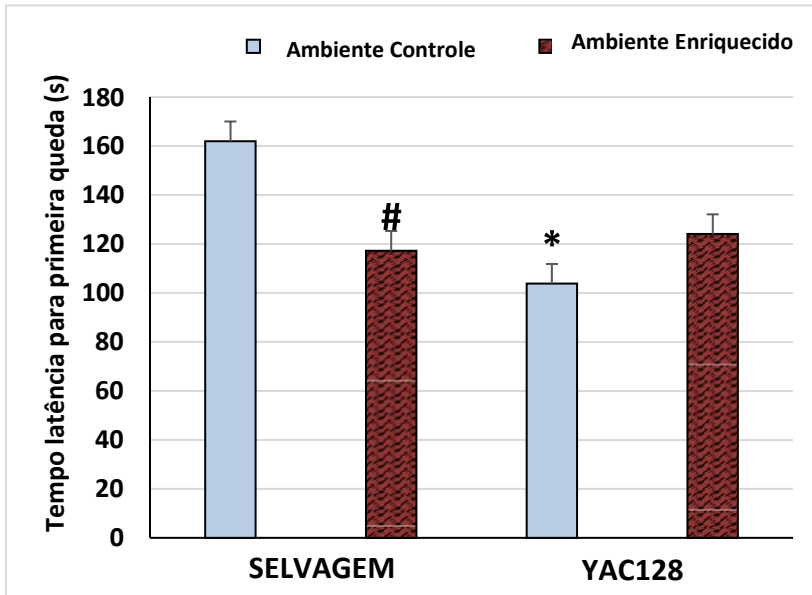
**Figura 10.** Tempo total para descida no Pole Teste de camundongos selvagens e YAC128 expostos ao EA e AC.



**Figura 10.** Os valores indicam a média do tempo total para descida de camundongos selvagens e YAC128 aos 4 meses de idade. Os resultados foram expressos como média + E.P.M. n=8-10 por grupo. #  $p < 0,05$  quando comparados com os animais transgênicos no AC. \*\*  $p < 0,01$  quando comparados com os animais selvagens no AC.

A avaliação dos animais no teste do Rotarod por meio da análise de ANOVA de duas vias revelou interação entre ambiente x genótipo [ $F(1, 36)=16,14$ ,  $p < 0,05$ ], e efeito do genótipo [ $F(1, 36) = 10,07$ ,  $p < 0,05$ ], enquanto não foi observado efeito do ambiente [ $F(1, 36) = 2,28$ ,  $p = 0,13$ ]. O teste *post-hoc* de Duncan revelou um efeito significativo do genótipo. Camundongos YAC128 do AC exibiram redução significativa do tempo de latência para queda quando comparados aos animais selvagens do mesmo grupo, demonstrando a presença do déficit motor nos animais transgênicos aos 4 meses de idade. Além disso, o EA diminuiu a latência para a primeira queda em camundongos selvagens (Figura 11).

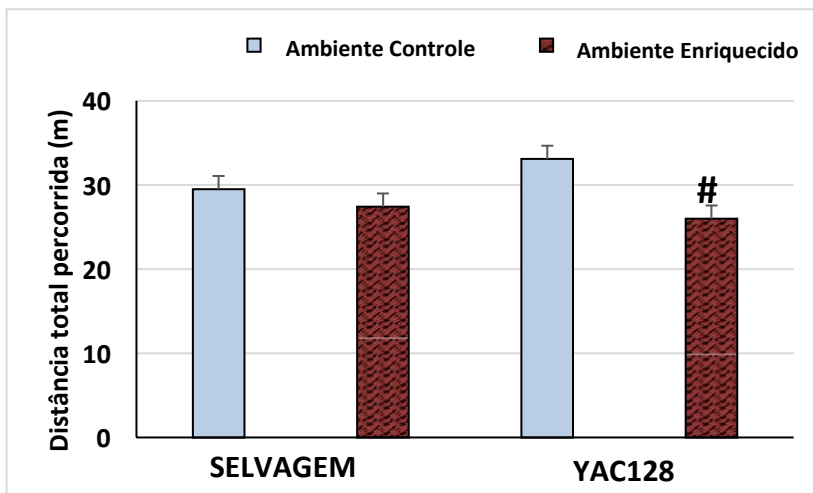
**Figura 11.** Média da latência para primeira queda no teste do Rotarod de camundongos selvagens e YAC128 expostos ao EA e AC.



**Figura 11.** Os valores indicam a média de latência para primeira queda de camundongos selvagens e YAC128 aos 4 meses de idade. Os resultados foram expressos como média + E.P.M.  $n=10$  por grupo. <sup>#</sup>  $p < 0,05$  quando comparados aos animais selvagens no AC. <sup>\*</sup>  $p < 0,05$  quando comparados aos animais selvagens no AC.

O teste do Campo Aberto foi realizado para verificar possíveis alterações na atividade locomotora dos animais. A ANOVA de duas vias não revelou efeitos do genótipo [ $F(1, 36) = 0,48, p = 0,49$ ], ou interação ambiente x genótipo [ $F(1, 36) = 2,56, p = 0,11$ ]. No entanto, um efeito do ambiente foi encontrado [ $F(1, 36) = 8,57, p < 0,05$  (**Figura 12**)]. A fim de verificar esta diferença, foi realizado o teste  $t$  de Student, revelando o efeito do EA nos animais transgênicos YAC128 ( $p < 0,05$ ), diminuindo a distância percorrida quando comparados aos animais YAC128 no AC.

**Figura 12.** Distância total percorrida no teste do Campo Aberto de camundongos selvagens e YAC128 expostos ao EA e AC.



**Figura 12.** Os valores indicam a média da distância total percorrida de camundongos selvagens e YAC128 aos 4 meses de idade. Os resultados foram expressos como média + E.P.M.  $n=10$  por grupo. #  $p < 0,05$  quando comparados aos animais transgênicos no AC.

Sabendo que roedores são animais exploratórios por natureza e que quando expostos em locais abertos preferem se locomover pela periferia, analisou-se o tempo que os camundongos selvagens e YAC128 gastaram explorando as regiões do centro e periferia do campo aberto (**Tabela 1**). A ANOVA de duas vias revelou não haver efeito do ambiente [ $F(1, 36) = 2,37, p = 0,13$ ], nem do genótipo [ $F(1, 36) = 0,96, p = 0,33$ ], e nem interação ambiente x genótipo [ $F(1, 36) = 1,57, p = 0,21$ ] no tempo gasto no centro ou na periferia.

**Tabela 1. Média de tempo gasto nas regiões do centro e periferia no teste do Campo Aberto de camundongos selvagens e YAC128 expostos ao EA e AC.**

<b>Genótipo</b>	<b>Ambiente</b>	<b>Tempo no Centro (s)</b>	<b>Tempo na Periferia (s)</b>
Selvagem	Controle	20,80	339,20
Selvagem	Enriquecido	34,03	325,97
YAC128	Controle	22,10	337,90
YAC128	Enriquecido	23,45	336,55

**Tabela 1.** Os valores indicam o tempo total gasto nas regiões do centro e periferia no teste do Campo Aberto de camundongos selvagens e YAC128 aos 4 meses de idade. Observa-se que o tempo gasto na região da periferia é muito superior quando comparado ao tempo gasto no centro nos diferentes genótipos e ambientes. Os resultados foram expressos como média + E.P.M. n= 10 por grupo.

### 5.3 EFEITOS DO AMBIENTE NA MEMÓRIA DE LONGO PRAZO EM CAMUNDONGOS SELVAGENS E YAC128

O teste da Esquiva Inibitória foi realizado para avaliar a capacidade de retenção de memória dos camundongos selvagens e YAC128 ao levar um choque de pequena intensidade ao descer da plataforma. Foi realizado o teste *t* de Student entre as fases de treino e teste a fim de verificar o aprendizado dos animais. Todos os animais aprenderam a tarefa, aumentando a latência de descida para a plataforma no dia do teste (**Tabela 2**).



**Tabela 2. Teste *t* entre as fases de treino e teste para tempo de latência para descida da plataforma no teste de Esquiva Inibitória de camundongos selvagens e YAC128.**

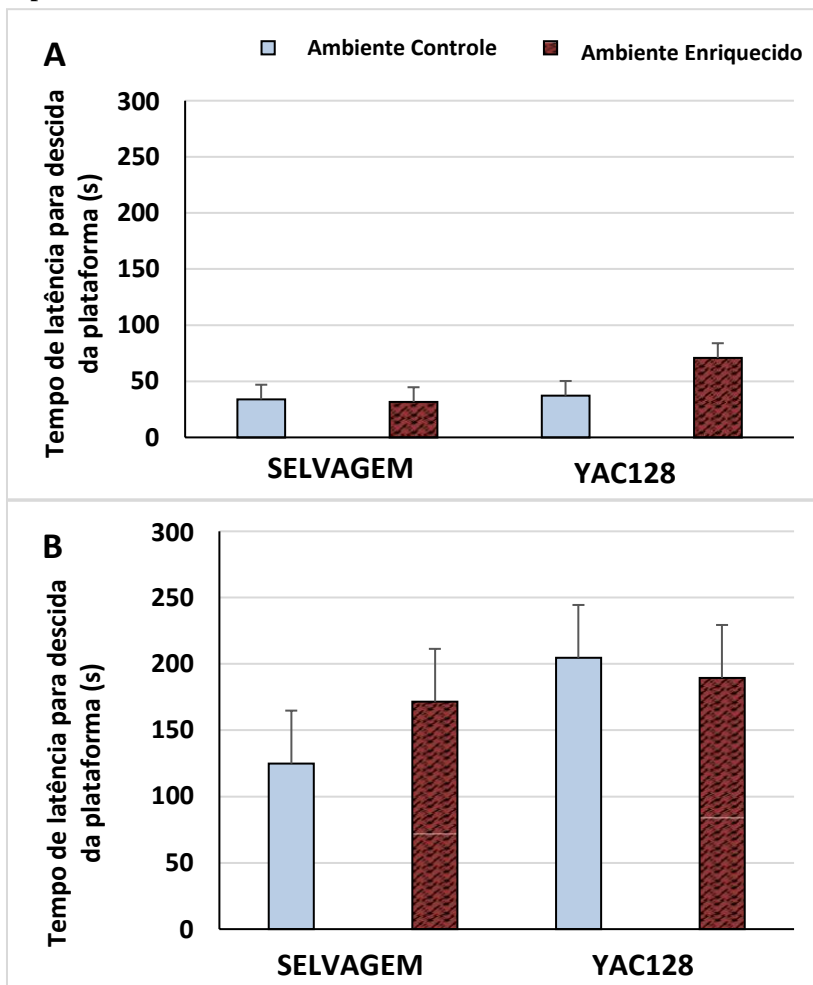
Genótipo	Ambiente	Valor de <i>p</i> (Treino x Teste)
Selvagem	Controle	0,03
Selvagem	Enriquecido	0,01
YAC128	Controle	0,0006
YAC128	Enriquecido	0,004

**Tabela 2.** Os valores indicam o valor de *p* referente aos tempos de latência para descida da plataforma entre o dia treino e o dia teste de camundongos selvagens e YAC128 aos 4 meses de idade. Observa-se que todos os animais aprenderam. Os resultados foram considerados significativos quando  $p \leq 0,05$ .  $n=9$  por grupo.

Embora todos os animais demonstrarem o aprendizado na tarefa, ao realizar o teste *t* de Student entre os ambientes (EA x AC) dentro de cada genótipo não foram observadas diferenças significativas (Selvagens: treino  $p = 0,82$ , teste  $p = 0,29$ ; YAC128: treino  $p = 0,19$ , teste  $p = 0,78$ ).

A **Figura 13A** representa as médias de tempo para descida da plataforma no dia de treino, constatando que a maioria dos animais desceram da plataforma antes de transcorridos 50 segundos do início do teste. Na **Figura 13B** estão representadas as médias de tempo para descida da plataforma no dia de teste, constatando que todos os animais aumentaram o tempo de latência para descida da plataforma.

**Figura 13.** Tempo de latência para descida da plataforma no teste de Esquiva Inibitória no dia de treino e teste de camundongos selvagens e YAC128 expostos ao EA e AC.



**Figura 13A.** Os valores indicam o tempo de latência para descida da plataforma no dia de treino de camundongos selvagens e YAC128 aos 4 meses de idade. Os resultados foram expressos como média + E.P.M. n=9 por grupo. **Figura 13B.** Os valores indicam o tempo de latência para descida da plataforma no dia de teste de camundongos selvagens e YAC128 aos 4 meses de idade. Os resultados foram expressos como média + E.P.M. n=9 por grupo.

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi investigado se a exposição a uma condição de EA é capaz de modular os sintomas pré-motores presentes no modelo animal YAC128 da DH. Este modelo possui um fenótipo muito semelhante ao de um indivíduo portador da DH, o que o torna uma excelente ferramenta para estudos de potenciais estratégias terapêuticas. Já a condição de EA é uma das terapias não farmacológicas que vem sendo estudada em diversos modelos pré-clínicos de doenças neurodegenerativas (MIROCHNIC et al., 2009, HERRING et al., 2010; FAHERTY et al., 2005; JADAVJI et al., 2006), e seus benefícios podem também ser observados em pacientes com DH (SULLIVAN et al., 2001; ZINZI et al., 2007).

Uma bateria de testes comportamentais foi realizada para caracterizar o fenótipo sintomático inicial da doença nos camundongos YAC128 (comportamento tipo-depressivo, déficit cognitivo, disfunção motora), bem como observar os possíveis efeitos da condição de EA em ambos os genótipos.

A análise do comportamento tipo-depressivo foi feita por meio dos testes TBS e TSC. O TBS foi desenvolvido como um teste de comportamento anedônico, já que a anedonia é caracterizada pela perda da sensação de prazer ou a falta de reatividade a estímulos prazerosos, e é um dos principais sintomas do transtorno depressivo maior (American Psychiatric Association, 2000). Neste trabalho os camundongos YAC128 não apresentaram comportamento anedônico, indo de encontro ao que já foi demonstrado em trabalhos anteriores (POULADI et al., 2009), tão pouco demonstrou efeito do EA, como demonstrado no estudo de Renoir et al., 2013 que não observou efeito significativo no teste de preferência da sacarose no modelo animal R6/1.

O TSC é um teste que expõe o animal a uma experiência de desespero comportamental, que pode ser entendido pela postura de desistência ou fracasso diante de uma situação inescapável (PORSOLT et al., 1977). Animais com comportamento tipo-depressivo possuem latências menores e períodos maiores de imobilidade total neste teste. Os camundongos YAC128 apresentaram comportamento tipo-depressivo aos 4 meses de idade, observado pelo aumento no tempo de imobilidade no TSC, corroborando com trabalhos anteriores do nosso grupo (FONSÊCA et al., submetido), e demais que demonstraram que os camundongos YAC128 apresentam comportamento tipo-depressivo em outro teste de desespero comportamental, o teste do nado forçado

(TNF) (POULADI et al., 2009). A condição de EA não apresentou efeito significativo no TSC, corroborando com achados anteriores no TNF com modelo animal da DH R6/1 com 8 semanas de idade (RENOIR et al., 2013).

Para avaliar a atividade locomotora dos animais transgênicos YAC128 foram realizados três testes comportamentais. A avaliação do Pole teste demonstrou o déficit motor já observado nos camundongos YAC128 na idade de 4 meses (SLOW et al., 2003; VAN RAAMSDONK et al., 2005; POULADI et al., 2009), observado pelo aumento no tempo para descida. A exposição ao EA reduziu significativamente o tempo para descida dos camundongos YAC128, revertendo a condição normal do modelo animal. No entanto, mais estudos são necessários para validação do teste, visto que nenhum outro estudo realizou este tipo de teste no modelo YAC128.

Na avaliação do teste do Rotarod, observamos novamente o déficit motor presente nos camundongos YAC128 aos 4 meses de idade (SLOW et al., 2003; VAN RAAMSDONK et al., 2005; POULADI et al., 2009). Entretanto, diferentemente de estudos que observaram efeitos benéficos do EA no desempenho dos animais no Rotarod (STEVENTON et al., 2015; KREILAU, et al., 2016; WOOD et al., 2011), em nosso estudo o EA não foi capaz de reverter os déficits motores nos camundongos YAC128. Interessantemente, o EA diminuiu a latência para queda dos animais selvagens. Estudos anteriores com outros modelos animais da DH (R6/1 e R6/2) observaram um efeito benéfico do EA nos animais selvagens (WOOD et al., 2011; HARRISON et al., 2013), ao mesmo tempo que outros usando o mesmo modelo, R6/1, não demonstram nenhum efeito (MAZARAKIS et al., 2014). Pode-se considerar, então, que a exposição ao EA neste trabalho foi capaz de melhorar a coordenação e equilíbrio nos camundongos YAC128, observado no Pole Teste, no entanto, não teve efeito na resistência e força, características avaliadas pelo Rotarod.

O teste do Campo Aberto foi utilizado para validar os resultados encontrados no TSC. Uma vez que abordagens terapêuticas que alteram a locomoção podem gerar resultados falsos positivos ou negativos neste teste. Nossos resultados demonstraram não haver alterações na locomoção entre ambiente e genótipo, indicando não haver influência de alteração da atividade locomotora nos resultados do TSC. Curiosamente, o EA diminuiu a distância total dos camundongos YAC128 neste estudo, divergindo de estudos anteriores que demonstraram um aumento da atividade locomotora de modelos animais da DH (R6/1 e R6/2) expostos ao EA (MAZARAKIS et al., 2014; SKILLINGS et al., 2014), ainda que com idades, tempos e protocolos de exposição distintos do presente trabalho.

Finalizando a análise comportamental, foi realizado o teste de Esquiva Inibitória, que demonstrou que todos os animais aprenderam a tarefa e não houve diferença na retenção da memória aversiva entre os genótipos ou ambientes. Nosso resultado difere dos resultados de Van Raamsdonk et al., (2005) que demonstrou déficits cognitivos em camundongos YAC128 aos 2 meses de idade avaliados pelo teste do labirinto aquático em T. Essa discrepância nos resultados pode ser devido ao fato que os déficits cognitivos nas fases iniciais da DH são sutis e a esquiva inibitória é um teste de memória aversiva bem diferente do teste usado por Van Raamsdonk e colaboradores (2005). Portanto, mais estudos são necessários para validação dos déficits cognitivos no modelo animal YAC128.

Vale salientar que as discrepâncias encontradas entre o presente estudo e demais publicações podem ser devido às diferenças nos protocolos experimentais utilizados, bem como nos modelos animais. O modelo animal R6/1 e R6/2, apesar de possuírem números diferentes de repetições de CAG comparados aos camundongos YAC128, não expressam o gene inteiramente, enquanto que os animais transgênicos YAC128 expressam, o que pode alterar as diferentes características neurobiológicas que influenciam os diferentes comportamentos.

Ainda, vale ressaltar que diversos são os parâmetros que necessitam ser analisados ao promover uma condição de EA. A complexidade estrutural e a quantidade de estímulos dentro de uma caixa enriquecida, o tempo de intervenção e a natureza das condições de controle são critérios a serem considerados ao analisar as consequências de uma modulação ambiental (MO et al., 2016). À vista disso, pode-se considerar que, neste trabalho, possivelmente o tempo de exposição ao EA e/ou os padrões de estímulos não tenham sido o suficiente, ou adequados, para que a modulação do ambiente exercesse um efeito benéfico nos camundongos YAC128. Apesar da intervenção de um período de dois meses não ter demonstrado efeito, os estágios iniciais da DH presentes no modelo animal transgênico são os mais indicados para aplicação de terapias que buscam o retardo dos sintomas motores e modulação dos sintomas pré-motores.

Embora diversos estudos demonstrem efeito benéfico do EA em modelos animais da DH, inclusive em indivíduos portadores da DH (FRESE et al., 2016), estudos futuros testando outros tipos de estímulos e por diferentes períodos são necessários para elucidar os mecanismos biológicos do EA na DH.

## 7 CONCLUSÃO

Poucos são os trabalhos que estudaram os efeitos do EA na DH. Para o melhor do nosso conhecimento este é o único estudo a aplicar a metodologia de EA em camundongos YAC128 da linhagem FVB/N.

Os resultados encontrados no presente estudo demonstraram haver um maior efeito benéfico do EA nos camundongos selvagens do que nos camundongos YAC128. No entanto, os achados deste trabalho não significam que efeitos mais pronunciados não pudessem ter sido detectados em estágios mais avançados da doença. Ainda, no presente trabalho houve apenas a possibilidade de analisar os efeitos de um EA completo, com estímulos inanimados e uma roda de corrida voluntária. Futuros protocolos devem ser realizados a fim de verificar os efeitos de cada tipo de estímulo separadamente, para uma melhor interpretação das conclusões deste trabalho.

Para tanto, estudos futuros são necessários a fim de corroborar com a eficiência do EA como possível terapia não farmacológica para retardar os sintomas pré-motores da DH.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic criteria from dsmn-iv-tr. **American Psychiatric Pub.** ISBN 0890420270, 2000.

BAKER, L. D., FRANK, L. L., FOSTER-SCHUBERT, K., GREEN, P. S., WILKINSON, C. W., MCTIERNAN, A., et al. Effects of aerobic exercise on mild cognitive impairment: a controlled trial. **Arch. Neurol.** v. 67, n. 1, p. 71–79, jan. 2010.

BATES, G. P. et al. Huntington disease. **Nat. Rev. Dis. Primers.** 23;1:15005, 2015.

BENAROYA-MILSHTEIN, N.; HOLLANDER, N.; APTER, A.; KUKULANSKY, T.; RAZ, N.; WILF, A.; YANIV, I.; PICK, C. G. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. **Eur J Neurosci.** v. 20, n. 5, p. 1341-1347, set. 2004.

BENNETT, E. L.; ROSENZWEIG, M. R.; DIAMOND, M. C. Rat brain: effects of environmental enrichment on wet and dry weights. **Science.** v. 163, n. 3869, p. 825-826, fev. 1969.

BOUET, V.; FRER, T.; DUTAR, P.; BILLARD, J. M.; BOULOUARD, M. Continuous enriched environment improves learning and memory in adult NMRI mice through theta burst-related-LTP independent mechanisms but is not efficient in advanced aged animals. **Mech Ageing Dev.** v. 132, n. 5, p. 240-248, mai. 2011.

BRENES, J. C.; PADILLA, M.; FORNAGUERA, J. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. **Behav Brain Res.** v. 197, n. 1, p. 125-137, jan. 2009.

BRUEL-JUNGERMANN, E.; LAROCHE, S.; RAMPON, C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. **Eur J Neurosci.** v. 21, n. 2 p. 513-521, jan. 2005.

CAMMAROTA, M. N.; BEVILAQUA, L. R.; KERR, D.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstatement of an extinguished conditioned fear response. **The Journal of neuroscience**. v. 23, n. 3, p. 737-741, fev. 2003.

CARTER, R. J.; MORTON, J.; DUNNETT, S. B. Motor coordination and balance in rodents. **Curr Protoc Neurosci**. Chapter 8:Unit 8.12, 2001.

DIAMOND, M. C.; KRECH, D.; ROSENZWEIG, M. R. The effects of na enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex. **J Comp Neurol**. 123:111-120, ago. 1964.

EHRNHOFER, D. E.; BUTLAND, S. L.; POULADI, M. A.; HAYDEN, M. R. Mouse models of Huntington disease: variations on a theme. **Dis Model Mech**. v. 2, n. 3-4, p. 123-9, mar-abr. 2009.

EVANS, S. J. W. et al. Prevalence of adult Huntington's disease in the UK based on diagnoses recorded in general practice records. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**. 84:1156-1160, 2013.

FAHERTY, C. J., RAVIIE, S. K., HERASIMTSCHUK, A., SMEYNE, R. J. Environmental enrichment in adulthood eliminates neuronal death in experimental Parkinsonism. **Brain Res Mol Brain Res**. v. 134, n. 1, p. 170-9, mar. 2005.

FARRER, L. A. Suicide and attempted suicide in Huntington disease: implications for preclinical testing of persons at risk. **Am J Med Genet**. v. 24, n. 2, p. 305-11, jun. 1986.

FISHER, e. R. & HAYDEN, M. R. Multisource ascertainment of Huntington disease in Canada: prevalence and population at risk. **Mov. Disord**. 29:105-114, 2014.

FONSÊCA, V. S. et al. Brain-derived neurotrophic factor prevents depressive-like behaviors in early-symptomatic YAC128 Huntington's disease mice. Artigo submetido para a revista **Neurobiology of Disease**.

FRATIGLIONI, L., PAILLARD-BORG, S., WINBLAD, B. An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia. **Lancet Neurol**. v. 3, n. 6, p. 343-353, jun. 2004.



FRERET, T.; BILLARD, J. M.; SCHUMANN-BARD, P.; DUTAR, P.; DAUPHIN, F.; BOULOUARD, M.; BOUET, V. Rescue of cognitive aging by long-lasting environmental enrichment exposure initiated before median lifespan. **Neurobiol Aging**. v. 33, n. 5, p. 1005.e1-10, mai. 2012.

FRESE, S. et al. Exercise effects in Huntington disease. **J Neurol**. v. 264, n. 1, p. 32-39, jan. 2017.

GALANI, R.; BERTHEL, M.-C.; LAZARUS, C.; MAJCHRZAK, M.; BARBELIVIEN, A.; KELCHE, C.; CASSEL, J.-C. The behavioral effects of enriched housing are not altered by serotonin depletion but enrichment alters hippocampal neurochemistry. **Neurobiol Learn Mem**. v. 88, n. 1, p. 1-10, jul. 2007.

GARCIA RUIZ, P. J.; TORTOSA, E. G; BERNADOS, V. S.; ROJO, A., FONTÁN, A.; DE YEBENES J., G. Bradykinesia in Huntington's disease. **Clin Neuropharmacol**. v. 23, n. 1, p. 50-2, jan. 2000.

GELFO, F.; CUTULI, D.; FOTI, F.; LARICCHIUTA, D.; DE BARTOLO, P.; CALTAGIRONE, C.; PETROSINI, C.; ANGELUCCI, F. Enriched environment improves motor function and increases neurotrophins in hemicerebellar lesioned rats. **Neurorehabil Neural Repair**. v. 25, n. 3, p. 243–252, mar-abr. 2011.

GIL, J. M. & REGO, A. C. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. **Eur J Neurosci**. v. 27, n. 11, p. 2803-20, jun. 2008.

GIL-MOHAPEL, J. M.; SIMPSON, J. M.; GHILAN, M.; CHRISTIE, B. R. Neurogenesis in Huntington's disease: can studying adult neurogenesis lead to the development of new therapeutic strategies? **Brain Res**. v. 1406, p. 84-105, ago. 2011.

GUSELLA, J. F.; WEXLER, N. S.; CONNEALLY, P. M.; NAYLOR, S. L.; ANDERSON, M. A.; TANZI, R. E.; WATKINS, P. C.; OTTINA, K.; WALLACE, M. R.; SAKAGUCHI, A. Y.; SHOULSON, I.; BONILLA, E.; MARTIN, J. B. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. **Nature**. v. 306, n. 5940, p. 234-238, nov.

1983.

HARRISON, D. J.; BUSSE, M.; OPENSHAW, R.; ROSSER, A. E.; DUNNETT, S. B.; BROOKS, S. P. Exercise attenuates neuropathology and has greater benefit on cognitive than motor deficits in the R6/1 Huntington's disease mouse model. **Exp Neurol.** v. 248, p. 457-69, out. 2013.

HATTORI, S.; HASHIMOTO, R.; MIYAKAWA, T.; YAMANAKA, H.; MAENO, H.; WADA, K.; KUNUGI, H. Enriched environments influence depression-related behavior in adult mice and the survival of newborn cells in their hippocampi. **Behav Brain Res.** v. 180, n. 1, p. 69-76, jun. 2007.

HERRING, A.; BLOME, M.; AMBRÉE, O.; SACHSER, N.; PAULUS, W.; KEYVANI, K. Reduction of cerebral oxidative stress following environmental enrichment in mice with Alzheimer-like pathology. **Brain Pathol.** v. 20, n. 1, p. 166-75, jan. 2010.

HICKEY, M. A. & CHESSELET, M. F. The use of transgenic and knock-in mice to study Huntington's disease. **Cytogenet Genome Res.** v. 100, n. 1-4, p. 276-86, 2003.

HUANG, F. L.; HUANG, K. P.; WU, J.; BOUCHERON, C. Environmental enrichment enhances neurogranin expression and hippocampal learning and memory but fails to rescue the impairments of neurogranin null mutant mice. **J Neurosci.** v. 26, n. 23, p. 6230-6237, jun. 2007.

HUNTINGTON, G. On Chorea. **The Medical and Surgical Reporter: A Weekly Journal.** v. 26, n. 15, p. 317-321, abr. 1872.

HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. **Cell.** v. 72, n. 6, p. 971-983, mar. 1993.

ICKES, B. R.; PHAM, T. M.; SANDERS, L. A.; ALBECK, D. S.; MOHAMMED, A.H.; GRANHOLM, A. C. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. **Exp Neurol.** v. 164, n. 1, p. 45-52, jul. 2000.

ISINGRINI, E.; CAMUS, V.; LE GUIQUET, A. M.; PINGAUD, M.; DEVERS, S.; BELZUNG, C. 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, p. e10404, abr. 2010.

JADAVJI, N. M.; KOLB, B.; METZ, G. A. Enriched environment improves motor function in intact and unilateral dopamine-depleted rats. **Neuroscience**. v. 140, n. 4, p. 1127-38, jul. 2006.

JARVIK, M. E. & ESSMAN, W. B. A simple one-trial learning situation for mice. **Psychological Reports**. v. 6, n. 2, p. 290-290, fev. 1960.

JHA, S.; DONG, B.; SAKATA, K. Enriched environment treatment reverses depression-like behavior and restores reduced hippocampal neurogenesis and protein levels of brain-derived neurotrophic factor in mice lacking its expression through promoter IV. **Translational Psychiatry**. v. 1, p. e40, set. 2011.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F. H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**. v. 386, n. 6624, p. 493-495, abr. 1997.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F. H. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. **J Neurosci**. v. 18, n. 9, p. 3206-3212, mai. 1998.

KREILAUS, F.; SPIRO, A. S.; HANNAN, A. J.; GARNER, B.; JENNER, A. M. Therapeutic Effects of Anthocyanins and Environmental Enrichment in R6/1 Huntington's Disease Mice. **J Huntingtons Dis**. v. 5, n. 3, p. 285-296, out. 2016.

LEE, Y., BACK, J. H., KIM, J., KIM, S. H., NA, D. L., CHEONG, H. K., et al. Systematic review of health behavioral risks and cognitive health in older adults. **Int. Psychogeriatr**. v. 22, n. 2, p. 174-187, mar. 2010.

LLORENS-MARTÍN, M. V.; RUEDA, N.; MARTÍNEZ-CUÉ, C.; TORRES-ALEMÁN, I.; FLÓREZ, J.; TREJO, J. L. Both increases in immature dentate neuron number and decreases of immobility time in the forced swim test occurred in parallel after environmental enrichment of mice. **Neuroscience**. v. 147, n. 33, p. 631-638, jul. 2007.

LOPES, C.; RIBEIRO, M.; DUARTE, A. I.; HUMBERT, S.; SAUDOU, F.; PEREIRA DE ALMEIDA, L.; HAYDEN M.; REGO, A. C. IGF-1 Intranasal Administration Rescues Huntington's Disease Phenotypes in YAC128 Mice. **Mol Neurobiol**. v. 49, n. 3, p. 1126-1142, jun. 2014.

MARTINEZ-HORTA, S.; PEREZ-PEREZ, J.; VAN DUJN, E.; FERNANDEZ-BOBADILLA, R.; CARCELLER, M.; PAGONABARRAGA, J.; PASCUAL-SEDANO, B.; CAMPOLONGO, A.; RUIZ-IDIAGO, J.; SAMPEDRO, F.; LANDWEHRMEYERS, G. B.; SPANISH REGISTRY INVESTIGATORS OF THE EUROPEAN HUNTINGTON'S DISEASE NETWORK, KULISEVSKY, J. Neuropsychiatric symptoms are very common in premanifest and early stage Huntington's Disease. **Parkinsonism Relat Disord.** v. 25, p. 58-64, 2016.

MATSUURA, K.; KABUTO, H.; MAKINO, H.; OGAWA, N. Pole teste is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion. **J. Neurosci. Methods.** v. 73, n. 1, p. 45-48, abr. 1997.

MAZARAKIS, N. K.; MO, C.; RENOIR, T.; VAN DELLEN, A.; DEACON, R.; BLAKEMORE, C.; HANNAN, A. J. 'Super-Enrichment' Reveals Dose-Dependent Therapeutic Effects of Environmental Stimulation in a Transgenic Mouse Model of Huntington's Disease. **J Huntingtons Dis.** v. 3, n. 3, p. 299-309, 2014.

MIROCHNIC, S.; WOLF, S.; STAUFENBIEL, M.; KEMPERMANN, G. Age effects on the regulation of adult hippocampal neurogenesis by physical activity and environmental enrichment in the APP23 mouse model of Alzheimer disease. **Hippocampus.** v. 19, n. 10, p. 1008-1018, out. 2009.

MO, C.; RENOIR, T.; HANNAN, A. J. What's wrong with my mouse cage? Methodological considerations for modeling lifestyle factor and gene-environment interactions in mice. **J Neurosci Methods.** v. 265, p. 99-108, mai. 2016.

NITHIANANTHARAJAH, J. & HANNAN, A. J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nat Rev Neurosci.** v. 7, n. 9, p. 697-709, set. 2006.

NITHIANANTHARAJAH, J.; BARKUS, C.; MURPHY, M.; HANNAN, A. J. Gene-environment interactions modulating cognitive function and molecular correlates of synaptic plasticity in Huntington's disease transgenic mice. **Neurobiol Dis.** v. 29, n. 3, p. 490-504, mar. 2008.

ORTH, M.; HANDLEY, O. J.; SCHWENKE, C.; DUNNETT, S. B.; CRAUFURD, D.; HO, A. K.; WILD, E.; TABRIZI, S. J.; LANDWEHRMEYER, G. B.; INVESTIGATORS OF THE EUROPEAN HUNTINGTON'S DISEASE NETWORK. Observing Huntington's Disease: the European Huntington's Disease Network's REGISTRY. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. v. 82, n. 12, p. 1409-12, dez.2011.

PANG, T. Y.; STAM, N. C.; NITHIANATHARAJ, J.; HOWARD, M. L.; HANNAN, A. J. Differential effects of voluntary physical exercise on behavioral and brain-derived neurotrophic factor expression deficits in huntington's disease transgenic mice. **Neuroscience**. v. 141, n. 2, p. 569-584, ago. 2006.

PLA, P.; ORVOEN, S.; SAUDOU, F.; DAVID, D. J.; HUMBERT, S. Mood disorders in Huntington's disease: from behavior to cellular and molecular mechanisms. **Frontiers in Behav Neurosci**. v. 8, p. 135, abr. 2014.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther**. v. 229, n. 2, p. 327-336, out. 1977.

POULADI, M. A.; GRAHAM, R. K.; KARASINSKA, J. M.; XIE, Y.; SANTO, R. D.; PETERSÉN, A.; HAYDEN, M. R. 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, abr. 2009.

RAMPON, C.; TANG, Y. P.; GOODHOUSE, J.; SHIMIZU, E.; KYIN, M.; TSIEN, J. Z. Enrichment induces structural changes and recovery from non spacial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. **Nat Neurosci**. v. 3, n. 3, p. 238-244, mar. 2000.

RENOIR, T.; PANG, T. Y.; MO, C.; CHAN, G.; CHEVARIN, C.; LANFUMEY, L.; HANNAN, A. J. Differential effects of early environmental enrichment on emotionality related behaviours in Huntington's disease transgenic mice. **J Physiol**. v. 591, n. 1, p. 41-55, jan. 2013.

ROOS, R. A. Huntington's disease: a clinical review. **Orphanet J Rare Dis**. v. 5, p. 40, dez. 2010.

ROSS, C. A. & TABRIZI, S. J. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. **Lancet Neurol**. v. 10, n. 1, p. 83-98, jan. 2011.

ROSS, C. A.; AYLWARD, E. H.; WILD, E.J; LANGBEHN, D. R.;

LONG, J. D.; WARNER, J. H.; SCAHILL, R. I.; LEAVITT, B. R.; STOUT, J. C.; PAULSEN, J. S.; REILMANN, R.; UNSCHULD, P. G.; WEXLER, A.; MARGOLIS, R. L.; TABRIZI, S. J. Huntington disease: natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. **Nat Rev Neurol.** v. 10, n. 4, p. 204-16, abr. 2014.

ROSENZWEIG, M. R. Environmental complexity, cerebral change, and behavior. **Am Psychol.** v. 21, n. 4, p. 321-332, abr. 1966.

SINGHAL, G.; JAEHNE, E. J.; CORRIGAN, F. and BAUNE, B. Cellular and molecular mechanisms of immunomodulation in the brain through environmental enrichment. **Frontiers in Cellular Neuroscience.** v. 8, p. 97, abr. 2014.

SKILLINGS, E. A.; WOOD, N. I.; MORTON, A. J. Beneficial effects of environmental enrichment and food entrainment in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. **Brain Behav.** v. 4, n. 5, p. 675-86, set. 2014.

SLOW, E. J.; VAN RAAMSDONK, J.; ROGERS, D.; COLEMAN, S. H.; GRAHAM, R. K.; DENG, Y.; OH, R.; BISSADA, N.; HOSSAIN, S. M.; YANG, Y. Z.; LI, X. J.; SIMPSON, E. M.; GUTEKUNST, C. A.; LEAVITT, B. R.; HAYDEN, M. R. Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. **Hum Mol Genet.** v. 12, n. 13, p. 1555-1567, jul. 2003.

SPIRES, T. L.; GROTE, H. E.; VARSHNEY, N. K.; CORDERY, P. M.; VAN DELLEN, A.; BLAKEMORE, C.; HANNAN, A. J. Environmental enrichment rescues protein deficits in a mouse model of Huntington's disease, indicating a possible disease mechanism. **J Neurosci.** v. 24, n. 9, p. 2270-2276, mar. 2004.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology (Berl).** v. 85, n. 3, p. 367-370, 1985.

STEVENTON, J. J.; HARRISON, D. J.; TRUEMAN, R. C.; ROSSER, A. E.; JONES, D. K.; BROOKS, S. P. In Vivo MRI Evidence that Neuropathology is Attenuated by Cognitive Enrichment in the Yac128 Huntington's Disease Mouse Model. **J Huntingtons Dis.** v. 4, n. 2, p. 149-60, 2015.

SULLIVAN, F. R., BIRD, E. D., ALAPY, M., CHA, J. H. Remotivation therapy and Huntington's disease. **J. Neurosci. Nurs.** v. 33, n. 3, p. 136-142, jun. 2001.

TANG, Y. P.; WANG, H.; FENG, R.; KYIN, M.; TSIEN, J. Z. Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. **Neuropharmacology**. v. 41, n. 6, p. 779-790, nov. 2001.

VAN DELLEN, A.; BLAKEMORE, C.; DEACON, R.; YORK, D.; HANNAN, A. J. Delaying the onset of Huntington's in mice. **Nature**. v. 404, n. 6779, p. 721-722, abr. 2000.

VAN LOO, P. L.; VAN ZUTPHEN, L. F.; BAUMANS, V. Male management: Coping with aggression problems in male laboratory mice. **Lab Anim**. v. 37, n. 4, p. 300-313, out. 2003.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nat Rev Neurosci**. v. 1, n. 3, p. 191-198, dez. 2000.

VAN RAAMSDONK, J. M.; PEARSON, J. SLOW, E. J.; HOSSAIN, S. M.; LEAVITT, B. R.; HAYDEN, M. R. Cognitive dysfunction precedes neuropathology and motor abnormalities in the YAC128 mouse model of Huntington's disease. **J Neurosci**. v. 25, n. 16, p. 4169-80, abr. 2005.

VAN RAAMSDONK, J. M.; WARBY, S. C.; HAYDEN, M. R. Selective degeneration in YAC mouse models of Huntington disease. **Brain Res Bull**. v. 72, n. 2-3, p. 124-31, abr. 2007.

WALSH, R. N. & CUMMINS, R. A. The open-field test: a critical review. **Psychological Bulletin**. v. 83, n. 3, p. 482-504, mai. 1976.

WOOD, N. I, GLYNN, D., MORTON, A. J. "Brain training" improves cognitive performance and survival in a transgenic mouse model of Huntington's disease. **Neurobiol Dis**. v. 42, n. 3, p. 427-37, jun. 2011.

XU, Z.; HOU, B.; ZHANG, Y.; GAO, Y.; WU, Y.; ZHAO, S.; ZHANG, C. Antidepressive behaviors induced by enriched environment might be modulated by glucocorticoid levels. **Eur Neuropsychopharmacol**. v. 19, n. 12, p. 868-875, set. 2009.

ZINZI, P., SALMASO, D., DE GRANDIS, R., GRAZIANI, G., MACERONI, S., BENTIVOGLIO, A., et al. Effects of an intensive rehabilitation programme on patients with Huntington's disease: a pilot study. **Clin. Rehab**. v. 21, n. 7, p. 603-613, jul. 2007.